



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA**

TESI DI LAUREA

**RUOLO DI UN PEPTIDE MIMETICO DELL' APOLIPOPROTEINA A1 IN
MODELLI MURINI DI OBESITÀ INDOTTA DA DIETA**

RELATORE

Dott.ssa Claudia Kusmic

CANDIDATA

Azzurra Soluri

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

Indice

Sommario	4
Summary.	8
Introduzione	11
<u>Il tessuto adiposo e le adipochine</u>	14
L'adiponectina	16
La leptina	17
<i>Il ruolo della leptina nella regolazione del bilancio energetico</i>	18
<i>Azione periferica della leptina</i>	22
<i>La leptina ed il muscolo scheletrico</i>	23
<i>La leptino-resistenza</i>	23
<i>La leptina e il sistema cardiovascolare</i>	24
<u>Strategie terapeutiche nel trattamento dell'obesità</u>	25
I peptidi mimetici dell'apolipoproteina A1 ed il loro ruolo potenziale nel trattamento dell'obesità.	26
<u>Modelli sperimentali</u>	29
Modelli genetici di obesità	30
<i>Topo ob/ob</i>	30
<i>Topo db/db</i>	30
<i>Ratto fa/fa Zucker</i>	31

Modelli di obesità indotta dalla dieta	31
Modelli di interazione dieta-genotipo	32
Scopo della tesi	33
Materiali e metodi	34
<u>Animali e protocollo sperimentale</u>	34
Genotipizzazione degli animali.....	34
<i>Quantificazione di DNA</i>	35
<i>Amplificazione</i>	35
<i>Restrizione</i>	36
Protocollo sperimentale.....	37
Test di tolleranza all'insulina.....	40
Analisi dei parametri plasmatici.....	41
Imaging in Risonanza Magnetica (MRI)	42
Spettroscopia in Risonanza Magnetica (MRS)	43
Ecocardiografia.....	44
Analisi di espressione proteica.....	45
<i>Preparazione e quantificazione dei campioni cardiaci</i>	45
<i>Western Blot</i>	47
Analisi statistica	49

Risultati	50
Effetti sul peso corporeo, sull'intake energetico e sulla "feed efficiency".....	50
Effetti sui parametri plasmatici e sui marcatori di funzionalità epatica	52
Effetti sui livelli plasmatici di insulina, leptina, adiponectina e interleuchina-6	54
Effetti sulla resistenza all'insulina.....	57
Effetti sull'accumulo di grasso addominale.....	59
Effetti sull'accumulo di grasso epatico.....	61
Effetti sulla funzionalità cardiaca	64
Effetti sull'espressione proteica e sulla fosforilazione del recettore dell'insulina, di AKT e AMPK	67
Discussione	71
Bibliografia	76

Sommario

L'obesità è una condizione clinica caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo e costituisce un fattore di rischio per altre patologie, quali ipertensione, alterazioni cardiovascolari, diabete di tipo 2 ed alcuni tipi di tumore. Nell'insorgenza dell'obesità entrano in gioco fattori ambientali, quali la cattiva alimentazione e uno stile di vita sedentario, ed anche fattori genetici. Negli ultimi anni è emerso il ruolo che il tessuto adiposo può svolgere non solamente come organo di deposito, ma anche per la sua attività secretoria, mediante la produzione di ormoni, chiamati adipochine, come la leptina e l'adiponectina. In particolare la leptina, codificata dal gene dell'obesità (*ob*), è coinvolta nella regolazione del bilancio energetico e nel controllo omeostatico della massa di tessuto adiposo, sia mediante la sua azione a livello nervoso sui centri della fame e della sazietà che tramite azioni a livello periferico. L'assenza di sintesi di leptina, sia nell'uomo che nei roditori, porta ad iperfagia, diabete ed obesità grave. Per lo studio dell'obesità e delle patologie ad essa correlate sono stati utilizzati diversi modelli sperimentali murini, tra cui modelli genetici di obesità legata all'assenza di produzione di leptina (topo *ob/ob*) o del suo recettore (topo *db/db*) e modelli di obesità indotta dalla dieta. Recenti studi hanno inoltre preso in considerazione le proprietà terapeutiche dei peptidi mimetici dell'apolipoproteina A1 come potenziale strategia farmacologica per contrastare l'obesità e le sue complicanze, ed è stato dimostrato che uno di questi, il peptide L-4F, è in grado di ridurre l'insulino-resistenza ed il livello di adiposità in topi omozigoti *ob/ob*.

Lo scopo del presente studio è quello di caratterizzare l'effetto di una dieta ipercalorica e iperlipidica sullo sviluppo di obesità, insulino-resistenza ed

alterazioni della funzione cardiaca nel topo eterozigote *ob/+*, il quale presenta una parziale deficienza di leptina e può costituire un modello interessante per la comprensione delle interazioni tra componente genetica ed abitudini alimentari. Il presente lavoro è inoltre finalizzato allo studio dei possibili effetti terapeutici del trattamento con il peptide L-4F sui disordini metabolici e sulle disfunzioni cardiovascolari che sono stati evidenziati in questo modello sperimentale.

Il protocollo che è stato utilizzato ha previsto il confronto tra topi maschi *ob/+* di 8-10 settimane con wild-type dello stesso ceppo, sesso ed età, nutriti per 18 settimane con dieta standard o con dieta ad alto contenuto lipidico. Dalla decima settimana di dieta ipercalorica, un sottogruppo di animali wt e *ob/+* è stato trattato con il peptide L-4F, per le successive 8 settimane di studio.

In tutti i gruppi di animali, sono stati misurati:

- il peso corporeo e l'apporto calorico, durante tutto il periodo sperimentale;
- la sensibilità all'insulina, mediante test di tolleranza (IPITT), all'inizio dello studio e successivamente alle 10 e alle 18 settimane;
- l'accumulo di grasso a livello del tessuto adiposo, per mezzo di imaging in risonanza magnetica, ed a livello epatico, tramite spettroscopia, alla fine delle 18 settimane;
- la funzionalità cardiaca mediante ecocardiografia, all'inizio, dopo le prime 10 settimane ed al termine dello studio;
- i valori plasmatici di glicemia e insulinemia, il profilo lipidico ed enzimi markers della funzione epatica (AST, ALT, γ GT), così come i livelli circolanti di leptina, adiponectina e di un indice dello stato infiammatorio,

l'interleuchina-6 (IL-6), mediante test ELISA alla fine del periodo sperimentale;

- l'espressione proteica di molecole coinvolte nel metabolismo energetico, come il recettore dell'insulina e le chinasi AMPK e AKT, mediante Western Blot su campioni di tessuto cardiaco.

I risultati ottenuti hanno mostrato che la dieta iperlipidica determina un aumento del peso corporeo, del contenuto di grasso a livello epatico e del contenuto di tessuto adiposo, in particolare sottocutaneo, tuttavia con effetti significativamente più marcati negli animali *ob/+*. A queste alterazioni si associano aumenti nei livelli plasmatici di glucosio, colesterolo, ALT e AST; negli animali *ob/+* sono stati inoltre riscontrati livelli plasmatici aumentati di IL-6 ed una ridotta sensibilità all'insulina. Si è osservata inoltre una riduzione della funzionalità cardiaca (efficienza e contrattilità), particolarmente evidente negli animali eterozigoti, alla quale si accompagnano un aumento dello stato di fosforilazione del recettore dell'insulina ed una riduzione della fosforilazione a carico della chinasi AMPK. Questo dato, in particolare, indica una stretta relazione tra l'alterazione delle vie del segnale coinvolte nel metabolismo energetico cellulare e la manifestazione di complicanze cardiache, in questa particolare combinazione di genotipo e regime alimentare.

Dai dati ottenuti, il trattamento con il peptide L-4F sembra in grado, negli animali *ob/+*, di ridurre l'accumulo di grasso a livello del tessuto adiposo e del fegato, riducendo inoltre i parametri plasmatici dell'infiammazione, ripristinando la sensibilità all'insulina e recuperando in buona parte la funzionalità cardiaca. Questo recupero è anche associato alla riduzione del livello di fosforilazione del

recettore dell'insulina e alla normalizzazione della forma attiva della proteina AMPK.

Nell'insieme questi dati sono indicativi del fatto che un'insufficiente produzione di leptina, in presenza di un regime alimentare ipercalorico, produce effetti additivi rispetto a quelli dati dalla sola dieta e può quindi rappresentare una condizione aggravante nello sviluppo di disordini metabolici e di alterazioni cardiovascolari. Sebbene i nostri dati siano relativi ad un modello sperimentale e richiedano ulteriori approfondimenti nella comprensione dei meccanismi, gli effetti benefici osservati dopo trattamento con L-4F negli animali *ob/+* fanno ben sperare nella prospettiva di un utilizzo clinico di questo peptide, che potrebbe quindi rappresentare una strategia terapeutica alternativa nel trattamento dei disordini metabolici e delle alterazioni cardiovascolari, associati ad una carenza di leptina.

Summary

Obesity is a clinical condition characterized by an excessive body fat accumulation and represents a risk factor for other adverse health effects, such as hypertension, cardiovascular disease, type 2 diabetes, and cancer. Both environmental and genetic factors contribute to the pathogenesis of obesity. In recent years, research has focused on the role of adipose tissue not only as a purely energy storage, but as an endocrine organ through the production of hormones, called adipokines, including leptin and adiponectin.

Leptin, in particular, is codified by the *obesity* gene (*ob*) and is involved in the regulation of energetic balance and in the homeostasis of adipose mass, through its signaling actions on the central nervous system and peripheral organs. The lack of leptin synthesis leads to hyperphagia, diabetes and severe obesity, both in man and rodents. Several animal models, including genetic models of leptin (*ob/ob* mouse) or leptin receptor (*db/db* mouse) deficiency and diet-induced obesity models, have been used for the study of obesity and its complications. Recently, apolipoprotein A1 mimetic peptides have been suggested as potential pharmacological agents in the treatment of adiposity and related pathological conditions; in particular, the L-4F peptide has been shown to reduce insulin-resistance and body fat deposition in *ob/ob* mice.

The aim of this study is to characterize the effect of a hypercaloric, hyperlipidic diet on the development of obesity, insulin-resistance and cardiac dysfunction in the *ob/+* mouse, heterozygous with partial leptin deficiency. This experimental model could be interesting for the comprehension of the interactions between genetic background and dietetic habits.

Moreover, we have investigated the possible therapeutical effects of L-4F peptide treatment on the development of metabolic and cardiovascular disorders in wild type and *ob/+* animals.

To this purpose, male C57BL/6 wild type (wt) and *ob/+* 8-10 week-old mice were fed with standard or High Fat diet over a period of 18 weeks. Among animals fed with the hyperlipidic diet, a subgroup of wt and *ob/+* mice were treated with L-4F peptide (2mg/kg, daily i.p.), starting from the tenth week of diet until the end of the study.

In each group we measured:

- body weight and caloric intake over the whole experimental period;
- insulin sensitivity, by intraperitoneal insulin tolerance test (IPIIT), at the beginning of the study (t_0), and after 10 and 18 weeks;
- body fat content, by magnetic resonance imaging, and hepatic fat by magnetic resonance spectroscopy, at 18 weeks;
- cardiac function, by echocardiography, at the beginning, at 10 weeks and at the end of the study;
- plasma levels of glucose, insulin, lipids (cholesterol and triglycerides) and hepatic markers (AST, ALT, γ GT), as well as circulating levels of leptin, adiponectin and an inflammatory marker (IL-6), by ELISA assays, at the end of the experimental period;
- protein expression of molecules involved in the energy metabolism, such as insulin receptor, and AKT and AMPK kinases, by Western Blot analysis on heart tissue samples.

The results have shown that High Fat diet determines an increase in body weight and hepatic and subcutaneous fat content, with significantly higher

effects in *ob/+* animals. Increased plasma levels of glucose, cholesterol, ALT and AST are associated with these alterations. Moreover in *ob/+* mice, fed with hyperlipidic diet, we have observed elevated plasma values of IL-6 and reduced insulin sensitivity. Under High Fat diet, a reduction in cardiac function (pump efficiency and contractility) is particularly evident in heterozygous mice, in which we also found increased phosphorylation level of insulin receptor and reduced phosphorylation of AMPK. All together these data are suggestive of a link between impaired metabolic signaling pathways and cardiac complications, in this combination of partial leptin deficiency and hypercaloric diet.

Treatment with L-4F is able to reduce fat accumulation in subcutaneous adipose tissue and liver, also reducing plasma markers of inflammation, normalizing insulin sensitivity and partially recovering cardiac function in *ob/+* mice. In these animals, treatment with L-4F is associated with the reduction of the phosphorylation of insulin receptor and the recovery of the active form of AMPK in heart tissue.

On the whole, our results indicate that a deficient leptin production can determine additive effects in the presence of a hypercaloric dietetic regimen, and so may represent a worsening condition in the onset of metabolic and cardiovascular disorders. Although these data are referred to an experimental model and need further studies, the beneficial effects observed following L-4F treatment in *ob/+* animals could support a future clinical use of this peptide as an alternative and personalized therapeutic strategy for the treatment of obesity complications.

Introduzione

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (Oms) l'obesità rappresenta uno dei principali problemi di salute pubblica nel mondo. L'obesità è una condizione caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo ed è un fattore di rischio per serie condizioni e patologie croniche come le malattie cardiovascolari, l'ictus, l'ipertensione arteriosa, il diabete tipo 2, le osteoartriti e alcuni tipi di tumore (corpo dell'utero, mammella e colon). Obesità e sovrappeso, prima considerati problemi solo dei Paesi ricchi, sono ora in crescita anche nei Paesi a basso e medio reddito, specialmente negli insediamenti urbani. Secondo i dati forniti dall'Oms, globalmente nel 2008, 1,5 miliardi di soggetti adulti (età maggiore di 20 anni) risultavano in sovrappeso e, tra questi, 200 milioni di uomini e circa 300 milioni di donne erano obesi. La condizione di eccesso ponderale rappresenta il quinto fattore di rischio per i decessi a livello mondiale, causando ogni anno la morte di circa 2,8 milioni di adulti (www.apps.who.int/infobase).

Un problema particolarmente grave è quello dell'insorgenza dell'obesità tra bambini e adolescenti che, a livello mondiale, ha raggiunto livelli allarmanti: nel 2010, circa 43 milioni di bambini sotto i 5 anni di età sono stimati in sovrappeso e di questi circa 35 milioni vivono in Paesi in via di sviluppo. Ad aumentare la preoccupazione sulla diffusione dell'obesità infantile è anche la predisposizione dei bambini obesi di diventare adulti obesi (www.epicentro.iss.it).

Questi dati e le previsioni future costituiscono un grave problema sia socio-politico che scientifico anche per lo scarso successo a tutt'oggi della prevenzione a lungo termine delle strategie di intervento sugli individui obesi o che hanno tendenza a diventarlo.

L'obesità deriva da uno squilibrio tra apporto calorico e consumo energetico a favore del primo, il che determina un eccessivo accumulo di grasso a livello del tessuto adiposo che, a sua volta, è associato all'insorgenza di numerosi effetti negativi per la salute dell'individuo. L'obesità è una patologia multifattoriale e nella patogenesi di questo quadro clinico entrano in gioco anche fattori ambientali; la cattiva alimentazione ed anche lo stile di vita sedentario, infatti, contribuiscono allo sviluppo dell'obesità. Inoltre l'insorgenza di questa patologia è legata anche a fattori genetici. Recentemente sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi alla base della regolazione del peso corporeo e dei geni coinvolti in questi processi.

A seconda della natura genetica, l'obesità può essere classificata in due sottogruppi: l'obesità monogenica, che è una forma estremamente rara, e l'obesità poligenica o comune, che colpisce la popolazione in generale e può essere associata a diversi rischi per la salute, come l'insorgenza di disturbi cardiovascolari.

Nel 1997 è stato descritto per la prima volta un difetto associato ad obesità riguardante un singolo gene. Questo gene, che è stato chiamato *ob* (da *obese*), codifica per l'ormone leptina, prodotta principalmente dal tessuto adiposo, e ritenuta uno dei più importanti regolatori del bilancio energetico nell'uomo (*Montague et al, 1997*).

Allo stato attuale, gli studi genetici condotti mediante analisi di "linkage" e gli studi di "genome wide association" hanno permesso di individuare più di 20 loci cromosomici coinvolti nell'insorgenza dell'obesità (*Scuteri et al, 2007; O'Rahilly, 2009; Herrera & Lindgren, 2010*). I geni che sembrano essere coinvolti nello sviluppo dell'obesità possono essere classificati in due principali categorie: geni

coinvolti nelle funzioni del sistema nervoso centrale e geni che si esprimono perifericamente, spesso a livello del tessuto adiposo. Molti geni localizzati vicino o all'interno delle regioni di associazione sono altamente espressi a livello del sistema nervoso centrale, in particolare a livello dell'ipotalamo, e sembrano essere coinvolti nella regolazione dell'appetito e della sazietà, nel controllo della spesa energetica e nel comportamento alimentare. Tra questi, il recettore 4 per la melanocortina (MC4R) sembra essere il responsabile dell'obesità, sia ad esordio precoce che in età adulta, in circa il 6% dei casi (*Chambers et al, 2008; O'Rahilly & Farooqi, 2008*).

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi che regolano il bilancio energetico ed i geni coinvolti utilizzando modelli murini (*Leibel et al, 1997; Zhang et al, 2004*). L'importanza di questi meccanismi, individuati nei modelli animali, è stata poi confermata dai rari casi clinici di obesità monogenica riscontrati nell'uomo (*Montague et al, 1997; Farooqi et al, 1999; Farooqi & O'Rahilly, 2004*).

Negli ultimi anni è inoltre emerso il ruolo che il tessuto adiposo può svolgere, non soltanto come organo di deposito ma anche come organo con funzione secretoria, nella patogenesi dell'obesità.

Il tessuto adiposo e le adipochine

L'obesità è principalmente caratterizzata da un eccesso di grasso corporeo o tessuto adiposo bianco. Gli alimenti forniscono l'energia necessaria all'espletamento dei vari processi biologici che continuamente si susseguono nel nostro organismo. Se assunti in eccesso parte dell'energia in essi contenuta, qualunque sia la sua origine (alcol, carboidrati, grassi o proteine), viene depositata nel tessuto adiposo come riserva energetica. I trigliceridi rappresentano il 65% del tessuto adiposo e circa il 90% della massa cellulare. Il tessuto adiposo è formato da cellule dette adipociti e nell'uomo si distinguono due tipi di tessuto adiposo, quello bruno (BAT dall'inglese *Bruno Adipose Tissue*) e quello bianco (WAT dall'inglese *White Adipose Tissue*).

La principale funzione del *tessuto adiposo bruno* è quella di produrre calore grazie al disaccoppiamento mitocondriale che, in queste cellule, dissocia la fosforilazione ossidativa dalla produzione di ATP. Il *tessuto adiposo bianco* è il più diffuso nell'organismo ed è costituito da pre-adipociti ed adipociti maturi, ma anche macrofagi e fibroblasti. L'aumento del grasso corporeo è causato dalla combinazione del differenziamento di pre-adipociti e dall'aumento delle dimensioni degli adipociti maturi. Il tessuto adiposo non ha solo la funzione di riserva energetica, ma ha anche una funzione meccanica, dato che occupa interstizi e riveste vasi, nervi e muscoli, ed anche una funzione termoisolante, in quanto il grasso, non conducendo calore, fa sì che il calore prodotto dall'organismo non venga disperso. Inoltre, come studi recenti stanno sempre più evidenziando, questo tessuto è coinvolto nella regolazione dell'appetito e del metabolismo, producendo importanti ormoni, le *adipochine*, coinvolti nei processi di regolazione dell'assunzione di cibo e della spesa calorica (*Trayhum*

& Bing, 2006). Fino a pochi anni fa, l'adipocita era ritenuto un semplice contenitore di trigliceridi; esso ha dimostrato, invece, di possedere una complessa attività metabolica e secretoria. Infatti, le cellule adipose bianche sono in grado di liberare sostanze ad azione autocrina (che hanno influenza sugli adipociti bianchi stessi), paracrina (che hanno effetto su cellule vicine come gli adipociti bruni) ed endocrina (ormoni che agiscono su cellule lontane dal tessuto adiposo). A somiglianza delle ghiandole endocrine, il tessuto adiposo è capace di regolare la liberazione dei propri prodotti non solo in rapporto alla variazione della massa adiposa, ma anche a stimoli che provengono dall'esterno, quali ormoni ipofisari o gastrointestinali, neurotrasmettitori e neurormoni. Le adipochine possono inoltre agire sul sistema nervoso centrale modificando circuiti che riguardano non solo il ricambio energetico ma anche numerose altre funzioni, quale ad esempio quella riproduttiva. Il tessuto adiposo bianco può essere quindi ritenuto un organo neuroendocrino o, quanto meno, mostrare attività funzionali tipiche del sistema neuroendocrino (Ahima, 2006). Un'altra caratteristica che accomuna il tessuto adiposo alle ghiandole endocrine è il fatto che ogni adipocita è circoscritto da una fitta rete vascolare, così che i prodotti di secrezione vengono rapidamente liberati nel circolo sanguigno. L'importanza che le adipochine possono avere quali molecole ormonali di segnale è legata all'abbondanza del tessuto adiposo così che possono avere un grande rilievo quantitativo anche se la produzione per cellula è modesta.

Il termine "adipochine" identifica citochine che sono principalmente prodotte dal tessuto adiposo, anche se non derivano esclusivamente da questo organo. Il numero sempre crescente di adipochine scoperte e descritte riflette

l'importanza del WAT come organo paracrino ed endocrino, la cui alterata funzione è strettamente associata con quadri clinici quali l'insulino-resistenza e le patologie dei vasi coronarici (*Matthieu et al, 2008*). Tra le principali adipochine ricordiamo l'adiponectina e la leptina.

L'adiponectina

L'adiponectina è una proteina di circa 28kDa, normalmente presente nel plasma umano in alte concentrazioni (5-30 mg/L). L'adiponectina forma omotrimeri ed esameri a basso peso molecolare (LMW) e multimeri di 12-18 monomeri ad alto peso molecolare (HMW) (*Pajvani et al, 2003*). Basandosi sulle osservazioni cliniche, la forma multimerica HMW è ritenuta essere quella biologicamente più attiva. L'adiponectina svolge un ruolo rilevante nella regolazione della funzione dell'insulina e nell'omeostasi energetica, riducendo l'introito alimentare e aumentando il dispendio energetico. I livelli circolanti di adiponectina e l'espressione genica nel tessuto adiposo sono ridotti nei soggetti obesi ed in quelli con diabete di tipo 2. I livelli circolanti risultano inversamente correlati con l'indice di massa corporea (BMI), con i livelli plasmatici di glucosio, di insulina e di trigliceridi e con il grado di insulino-resistenza (*Kadowaki et al, 2006*) e, anche per questo motivo, questa molecola suscita molto interesse per lo sviluppo di farmaci antidiabetici di nuova generazione. Oltre agli effetti sul metabolismo glucidico, l'adiponectina sembra esercitare importanti funzioni a livello vascolare e cardiaco, in particolare per quanto riguarda la funzione endoteliale, la protezione da danno da ischemia e riperfusione, gli effetti anti-infiammatori, antiapoptotici e anti-ipertrofici (*Shehzad et al, 2012*). L'effetto

vasoprotettivo dell'adiponectina sembra associato alle sue proprietà anti-infiammatorie e anti-aterogenetiche.

La leptina

La leptina (dalla radice greca *leptos* che significa magro) è un ormone di natura proteica, scoperto nel 1994, ha un peso molecolare di 16 kDa e viene codificata dal gene dell'obesità (*ob*); questo gene è stato individuato per la prima volta sul cromosoma 6 del topo, grazie alla tecnica del clonaggio posizionale (*Zhang et al, 1994*) e successivamente è stato individuato anche sul cromosoma 7 dell'uomo (*Isse et al, 1995*). Molti tessuti producono leptina, come la placenta, la mucosa del fondo gastrico, il tessuto muscolare scheletrico e l'ipofisi; la maggior produzione, comunque, resta a carico del tessuto adiposo. La sintesi di leptina segue un ritmo circadiano, con livelli più elevati tra la mezzanotte ed il primo mattino e livelli più bassi nel primo o a metà pomeriggio. I livelli di leptina circolanti possono essere più alti del 75.6% durante la notte rispetto ai valori che si registrano nel pomeriggio. La regolazione dei livelli plasmatici di leptina è dovuta alla quantità e allo stato funzionale degli adipociti, ma anche a diversi fattori endocrini. Il principale tra questi è il livello di insulina che, quando basso, diminuisce la sintesi di leptina; livelli non elevati di insulina sono infatti tipici di stati di digiuno, e la leptina viene di conseguenza inibita. Oltre all'insulina vi sono altri fattori che regolano i livelli circolanti di leptina, come il glucosio, i glucocorticoidi, gli estrogeni ed anche le citochine infiammatorie (*Friedman and Halaas, 1998*).

Il ruolo della leptina nella regolazione del bilancio energetico

La scoperta della leptina ha confermato l'esistenza di un canale di comunicazione tra tessuto adiposo e cervello, che ha lo scopo di regolare l'accumulo di grasso negli adipociti (figura 1). Quando le riserve lipidiche aumentano, le cellule adipose bianche accelerano la sintesi di leptina per segnalare all'ipotalamo che occorre ridurre l'assunzione di cibo. La leptina diminuisce il senso della fame (effetto anoressizzante) ed aumenta la spesa energetica, favorendo la riduzione del peso corporeo e della massa grassa. Al contrario, quando le riserve adipose diminuiscono, gli adipociti bianchi riducono la sintesi di leptina segnalando all'ipotalamo che occorre aumentare l'assunzione di cibo e ridurre la spesa energetica.

L'importanza della leptina nella regolazione dell'omeostasi corporea è evidenziata dagli studi condotti su individui che presentano una deficienza di questo ormone. In particolare, in uno studio del 2001 (*Farooqi et al, 2001*) è stato esaminato un gruppo di persone eterozigoti per il gene *ob*, e perciò parzialmente deficienti nella produzione di leptina, ed è stato dimostrato come alterazioni dei livelli di leptina circolanti possono direttamente influenzare l'accumulo di tessuto adiposo. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in studi eseguiti in roditori eterozigoti per il gene *ob* che codifica per la leptina (*Chung et al, 1998*). Si pensa quindi che anche modeste diminuzioni dei livelli di leptina possano essere rilevate dal sistema a feed-back che controlla l'omeostasi del bilancio energetico e che questo sistema aumenti la massa di tessuto adiposo per cercare di ristabilire i livelli di leptina.

La leptina svolge la sua azione mediante legame con specifici recettori (ObRs) localizzati sia a livello del sistema nervoso centrale che, anche, a livello di molti

tessuti periferici. Il recettore per la leptina è codificato dal gene *db* ed esistono almeno sei varianti o isoforme del recettore: ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf (*Lee et al, 1996*). Le isoforme ObRa e ObRc sembrano avere un ruolo importante nel trasporto della leptina attraverso la barriera emato-encefalica. L'isoforma ObRb è la principale responsabile della trasduzione del segnale di questa adipochina ed è espressa ad alti livelli in diverse regioni dell'ipotalamo. Il legame della leptina al recettore Ob-Rb induce la dimerizzazione di quest'ultimo ed attiva la trasduzione del segnale. Una delle vie principalmente implicate nella trasduzione del segnale della leptina è quella delle JAK/STAT, che coinvolge l'attivazione delle proteine JAK (Janus chinasi), che sono capaci di fosforilare entrambi i monomeri del recettore Ob-Rb (*Fruhbeck, 2006*). Questa fosforilazione crea siti nel recettore a cui si legano le proteine STAT (*Signal transducers and activators of transcription*, ossia trasduttori del segnale ed attivatori della trascrizione). Queste ultime, infine, vengono anch'esse fosforilate dalla JAK, dopodiché lasciano il recettore e si accoppiano, formando dimeri. I dimeri di STAT fosforilate si legano a sequenze specifiche di DNA, promuovendo l'espressione di alcuni geni.

La cascata del segnale indotta dalla leptina porta all'inibizione della sintesi di molti neuropeptidi oressigenici, mentre stimola la produzione di alcuni neuropeptidi anoressigenici. L'adipochina, infatti, agisce a livello del nucleo arcuato dell'ipotalamo, inibendo la sintesi del neuropeptide Y (NPY), un neurotrasmettitore che promuove l'appetito, e del peptide correlato alla proteina Agouti (AGRP); inibisce inoltre la produzione dell'ormone concentrante la melanina (MCH) e delle oressine, che sono potenti promotori dell'appetito (*Jequier, 2002*). Sempre a livello del nucleo arcuato, la leptina, legandosi al

recettore ObRb, stimola i neuroni a sintetizzare la pro-opiomelanocortina (POMC), una proteina precursore che dà origine all'ormone stimolante i melanociti (α -MSH); quest'ultimo è un neuropeptide che fa diminuire l'apporto di cibo agendo attraverso i recettori MC4R (melanocortin-4 receptor) e MC3R (melanocortin-3 receptor). Inoltre, la leptina stimola i neuroni a sintetizzare il CART (trascritto regolato dalla cocaina e dall'anfetamina), un'altra molecola che è in grado di inibire l'appetito (*Jequier, 2002; Dardeno et al, 2010*). L'importanza che questo sistema di neuropeptidi esercita nell'azione della leptina è avvalorata dalla scoperta che topi che sintetizzano o la leptina o i suoi recettori non funzionanti sono affetti da obesità ed hanno livelli significativamente ridotti di mRNA codificante per POMC e livelli notevolmente elevati di mRNA codificante per AgRP e NPY (*Thornton et al, 1997; Mizuno et al, 1998*).

Inoltre, mutazioni nel gene che codifica per la pro-opiomelanocortina (POMC) o nel gene per il recettore 4 della melanocortina (MC4R) portano ad una grave obesità sia nell'uomo che nei roditori (*Huszar et al, 1997; Vaisse et al, 1998; Yeo et al, 1998*).

La leptina è coinvolta anche negli aspetti edonistici dell'alimentazione e anche questo aspetto contribuisce al mantenimento dell'omeostasi corporea. La leptina infatti interagisce con il sistema mesolimbico, influenzando la sintesi del principale neurotrasmettitore di questo sistema, la dopamina (*Gao & Horvath, 2008*). Inoltre la leptina ha un ruolo anche nello sviluppo cerebrale e nella plasticità delle connessioni sinaptiche (*Matochik et al, 2005*).

Mediante la sua azione a livello dei centri nervosi della fame e della sazietà, la leptina quindi è direttamente coinvolta nella regolazione del bilancio energetico e nel controllo omeostatico della massa di tessuto adiposo. L'importanza del

ruolo che questa adipochina svolge all'interno dell'organismo è dimostrata dal fatto che l'assenza di sintesi di leptina, sia nell'uomo che nei roditori, porta non solo ad iperfagia, ma ha anche conseguenze fisiopatologiche quali diabete ed obesità grave. Inoltre, la delezione selettiva di tutte le isoforme del recettore della leptina porta ad obesità nel topo (*Cohen et al, 2001*), dimostrando l'importanza dell'azione nervosa della leptina nella regolazione del peso corporeo.

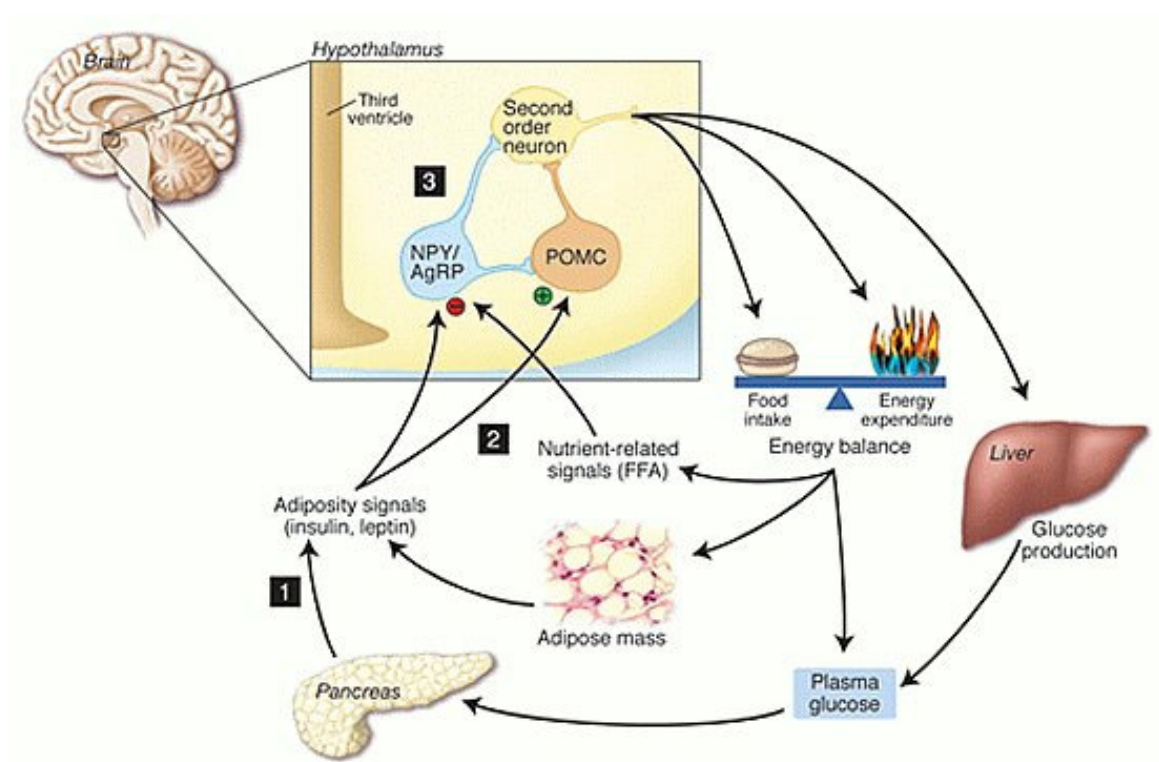


Figura 1. Azioni della leptina nella regolazione del bilancio energetico

Azione periferica della leptina

Oltre alle azioni esercitate dalla leptina a livello del sistema nervoso centrale, è emerso negli ultimi anni come questa adipochina possa esercitare funzioni anche a livello di organi periferici. Recentemente è stato dimostrato che la leptina influenza la funzione tiroidea regolando l'espressione dell'ormone rilasciante le tireotropine (TRH) (*Sanchez et al, 2004*) che, attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi stimola la secrezione della tireotropina (o TSH, ormone tireostimolante). Negli individui sani il TSH è secreto con un ritmo simile a quello della leptina; individui con una deficienza congenita di leptina hanno una secrezione alterata di TSH, suggerendo che la leptina potrebbe regolare il ritmo circadiano del TSH (*Mantzoros et al, 2001*). Inoltre, studi su topi hanno dimostrato un'influenza della leptina a livello del sistema riproduttivo: sembra infatti che questa molecola stimoli il fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) e quindi la secrezione di LH (ormone luteinizzante) ed FSH (ormone follicolo stimolante) da parte dell'ipofisi (*Swerdloff et al, 1976*). Oltre a questo, è stato da poco dimostrato che la leptina svolge un ruolo importante sul sistema immunitario ed in particolare sull'attività dei linfociti T. Essendo la leptina una citochina, l'omeostasi del timo e la secrezione di agenti infiammatori acuti come l'interleuchina-6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) possono essere modulati dalla leptina. La leptina ha quindi un'azione simile ad altre citochine infiammatorie, promuovendo la maturazione e differenziazione dei linfociti T helper 1 (*La Cava & Matarese, 2004*).

La leptina ed il muscolo scheletrico

Sebbene la leptina stimoli il trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico indirettamente attraverso l'ipotalamo ed il sistema nervoso simpatico, essa svolge anche un'azione diretta. La leptina è in grado di influenzare l'attività di una specifica chinasi, l'AMPK; questa proteina è una serina/treonina chinasi, altamente conservata nel corso dell'evoluzione dai lieviti all'uomo, ed è attivata da aumentati livelli di AMP o ATP. Questa chinasi, insieme alla proteina p38 contribuisce all'effetto della leptina sull'ossidazione degli acidi grassi e sull'uptake del glucosio. Nel muscolo scheletrico la leptina attiva l'AMPK che, a sua volta, determina la fosforilazione e l'inibizione dell'enzima acetil-coA carbossilasi con conseguente stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi (*Minokoshi et al, 2002*). Inoltre è stato riscontrato che nel muscolo scheletrico degli individui obesi, a differenza di quelli normopeso, un repressore (SOCS3) inibisce l'attivazione dell'AMPK da parte della leptina e questo contribuisce alla mancata regolazione del metabolismo degli acidi grassi che caratterizza l'obesità (*Steinberg et al, 2006*).

La leptino-resistenza

Nelle comuni forme di obesità, soprattutto quella indotta da dieta, si riscontrano frequentemente alti livelli plasmatici di leptina in correlazione all'incremento della massa di tessuto adiposo. Tuttavia all'aumentato livello di leptina circolante non corrisponde l'effetto atteso, ovvero non si ha un aumento della spesa energetica ed una riduzione dell'ingresso di cibo (*Frederich et al, 1995; Considine et al, 1996*). Questo suggerisce che gli individui obesi siano divenuti

“resistenti” all’effetto della leptina endogena. Il meccanismo alla base della leptino-resistenza può essere dovuto ad un ridotto trasporto della leptina a livello della barriera emato-encefalica, con conseguente ridotta disponibilità della leptina per il suo recettore nel sistema nervoso centrale, o ad un’inibizione del signaling della leptina nelle cellule bersaglio (*El-Haschimi et al, 2000; Munzberg, 2010*).

Gli studiosi hanno notato che nelle persone obese i recettori ipotalamici, pur non riuscendo a recepire il messaggio di astinenza del cibo dato dagli alti livelli di leptina, sono comunque sensibili al calo della concentrazione dell'ormone. Per questo motivo quando un obeso ingrassa lo stimolo della leptina viene "ignorato" e con esso anche la sua azione anoressigena; al contrario, quando un obeso tenta di dimagrire l'ipotalamo recepisce la diminuzione di leptina e spinge l'individuo alla ricerca del cibo. Il problema, quindi, non è dato da un difetto di leptina ma da una ridotta sensibilità recettoriale nei confronti del proprio ligando. La leptino-resistenza ad oggi è considerata uno dei maggiori fattori di rischio per l'obesità (*Morris & Rui, 2009; Munzberg, 2010*).

La leptina e il sistema cardiovascolare

L'iper-leptinemia e l'ipertensione arteriosa sono fattori in stretta correlazione fra loro e associati allo stato di obesità (*Aizawa-Abe et al, 2000*) e all'insufficienza cardiaca cronica, sia nell'uomo che in modelli animali (*Winters et al, 2000*). E' stato dimostrato che livelli elevati di leptina (quelli tipici della condizione di leptino-resistenza) aumentano la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule endoteliali (*Bouloumie et al, 1999; Yamagishi et al, 2001*) e stimolano la produzione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- α e IL-6;

queste ultime svolgono entrambe un'azione promotrice nei confronti dell'aterosclerosi e dell'ipertensione (*Loffreda et al, 1998*). La leptina, inoltre, ha un'effetto vasodilatatorio diretto, dato che è in grado di indurre la sintesi di ossido nitrico (NO), che è un potente vasodilatatore (*Fruhbeck, 1999; Winters et al, 2000*). Studi *in vitro* hanno dimostrato infatti che la leptina è in grado di modulare il tono vascolare delle arterie (*Kimura et al, 2000; Lembo et al, 2000*) in quanto, nelle cellule endoteliali, essa attiva la isoforma endoteliale di NO sintasi (e-NOS), aumentando così la produzione di ossido nitrico.

Strategie terapeutiche nel trattamento dell'obesità

L'obesità, intesa soprattutto come adiposità intra-addominale è associata all'aumento del rischio di complicanze cardiovascolari e all'insulino-resistenza, sia nell'uomo che nei modelli animali (*Larsson, 1991; Kannel et al, 1996*). L'obesità viscerale determina un moderato ma cronico stato di infiammazione caratterizzato da livelli circolanti aumentati di citochine pro-infiammatorie che contribuiscono all'insorgenza dell'insulino-resistenza e al peggioramento delle funzioni vascolari e cardiache (*Hotamisligil et al, 1996; Hotamisligil, 1999; Gustafson, 2010*). Infatti, topi transgenici con assenza di produzione di TNF α mostrano una maggiore sensibilità all'insulina e, in generale, una migliore omeostasi glucidica in presenza di obesità indotta da dieta (*Uysal et al, 1997*). Inoltre, topi *ob/ob* in cui sia stata indotta una sovraespressione di adiponectina evidenziano un grado di infiammazione ridotto ed una aumentata sensibilità all'insulina, accompagnata da un incremento degli adipociti di piccole

dimensioni (tipici del normale tessuto adiposo) rispetto a quelli di calibro maggiore (tipici del tessuto adiposo degli obesi) (*Kim et al, 2007*). Questi dati mettono in evidenza come misure tese a favorire il ripristino delle normali dimensioni degli adipociti possano prevenire o ridurre lo stato infiammatorio anche in presenza di obesità. Infine, nei topi *ob/ob*, la somministrazione di leptina riduce i depositi di tessuto adiposo e fa regredire le complicanze metaboliche, suggerendo quindi un ruolo chiave di questa adipochina nella strategia terapeutica dell'obesità. Tuttavia, con la scoperta delle alterazioni a carico dei recettori della leptina e del fenomeno della leptino-resistenza la speranza di utilizzare questa adipochina come possibile "farmaco" contro l'obesità si è notevolmente ridotta. Infatti la somministrazione di leptina esogena nella maggioranza dei pazienti obesi non induce alcuna perdita di peso.

Attualmente l'attenzione farmacologica per il trattamento dell'obesità è volta principalmente a riequilibrare il metabolismo del colesterolo, ed in particolar modo di quello di una classe specifica di lipoproteine, le HDL (lipoproteine ad alta densità). La ridotta distribuzione di colesterolo nelle HDL (HDL-c) sembra strettamente legata all'aumento di rischio cardiovascolare nelle patologie diabetiche e nell'obesità.

I peptidi mimetici dell'apolipoproteina A1 ed il loro ruolo potenziale nel trattamento dell'obesità

L'apolipoproteina A-1 (apoA-1), che contiene 243 aminoacidi, è la principale componente proteica delle HDL-c nel plasma. Il livello di ApoA-1 risulta più strettamente correlato con il ridotto rischio di aterosclerosi di qualunque altro

marker di HDL-c (*Maciejko et al, 1983*). L'apoA-1 previene l'ossidazione e l'aggregazione del colesterolo delle lipoproteine a bassa densità (LDL-c) nelle pareti dei vasi arteriosi e stimola l'efflusso del colesterolo dalle cellule vascolari stesse (*Khoo et al, 1990*). L'infusione di apoA-1 è in grado di frenare la progressione dell'aterosclerosi, promuovendone la regressione, con recupero dalla disfunzione endoteliale ed efflusso del colesterolo dai macrofagi presenti nelle lesioni aterosclerotiche (*Van der Velde, 2010*).

Sono stati fatti molti sforzi per disegnare peptidi analoghi ad apoA-1 capaci di promuovere la formazione di particelle simili a HDL-c ma con una potenza ed un'efficienza maggiorate *in vivo*. Anantharamaiah e colleghi, basandosi sulla capacità di formare eliche in maniera analoga a quella dell'apoA-1 umana, hanno cercato di sintetizzare un peptide più corto (*Anantharamaiah et al, 1985*). Trovarono che un peptide di 18 aminoacidi di sequenza DWLKAFYDKVAEKLKEAF, senza omologia con l'apoA-1, formava una classe di eliche anfipatiche simili a quelle di apoA-1. Chiamarono questo composto 18A (*Anantharamaiah, 1986*). Nel tempo fu scoperto che le caratteristiche di legame con i lipidi potevano essere migliorate bloccando i terminali polari con dei residui di fenilalanina (*Venkatachalapathi et al, 1993*). L'iniziale aggiunta di 2 residui ha dato origine ai composti 2F, con buone caratteristiche di legame con i lipidi ma che, tuttavia, non erano in grado di far regredire le lesioni aterosclerotiche in modelli animali (*Datta et al, 2001; Palgunachari et al, 1996*). Il passaggio successivo fu la sintesi dei composti 5F e 4F, con cinque e quattro residui idrofobici, rispettivamente. Il primo si dimostrò capace di inibire la formazione di lesioni aterosclerotiche se iniettato in topi alimentati a regime dietetico pro-aterogenico (*Garber et al, 2001*), mentre il secondo, se sintetizzato

dall'enantiomero D di tutti gli aminoacidi, poteva essere somministrato anche oralmente in modelli animali, promuovendo gli stessi effetti del composto 5F (Navab et al, 2002; Navab et al, 2004). Il peptide 4F, che contiene i residui di fenilalanina in posizione 3, 6, 14 e 18, è presente in due versioni: D-4F (composto da D-amminoacidi) e L-4F (composto da L-amminoacidi). Al momento questo peptide mimetico dell'apoA-1 è quello più studiato ed è considerato una promessa per il possibile trattamento dell'obesità e della sindrome metabolica. Uno studio clinico in fase 1 ha dimostrato che una singola dose orale di D-4F è in grado di aumentare la funzione anti-infiammatoria di HDL-c (Rader, 2006). Tanto D-4F che L-4F si sono dimostrati efficaci nel ridurre l'adiposità, aumentare i livelli di adiponectina, ridurre l'insulino-resistenza e la produzione di interleuchina-1 β e interleuchina-6 in topi omozigoti *ob/ob* (Peterson et al, 2008, Peterson et al 2009, Sherman et al, 2010).

In un recente studio del 2011 il trattamento con il peptide L-4F si è dimostrato efficace anche nel prevenire lo sviluppo di cardiomiopatie e disfunzioni coronariche in un modello murino di diabete di tipo 2 (Vecoli et al, 2011).

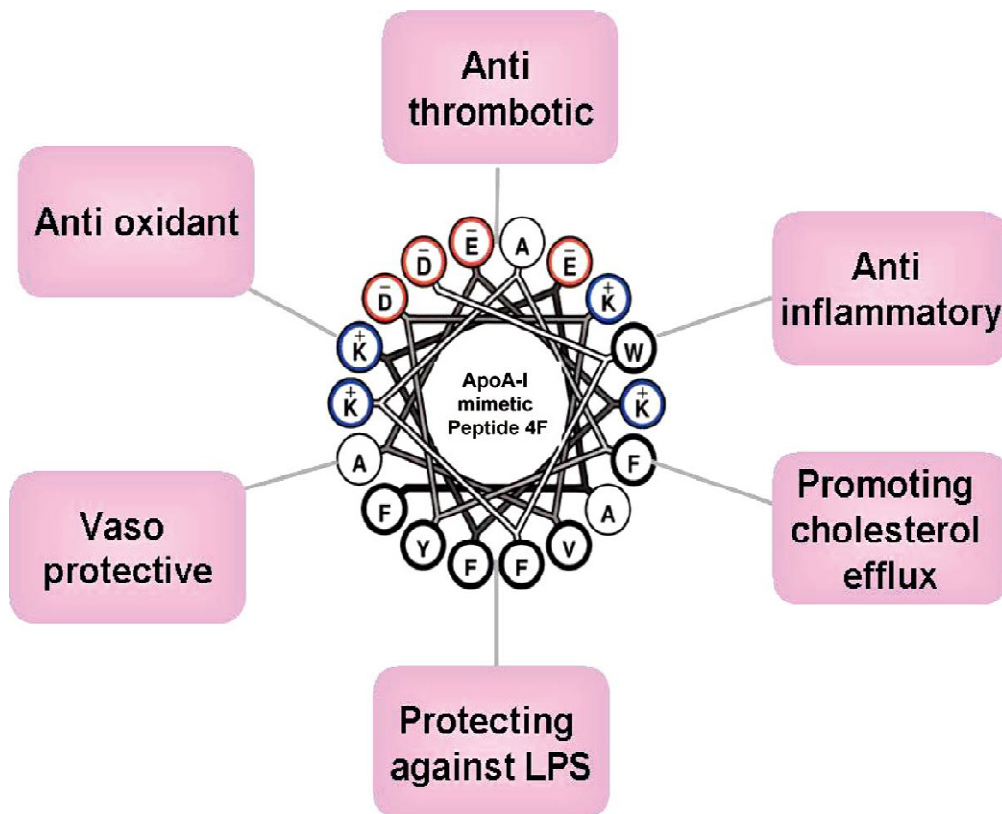


Figura 2. Effetti pleiotropici del peptide apolipoproteina A1 mimetico 4F
(da Imaizumi et al, 2011)

Modelli sperimentali

Per lo studio dell'obesità e delle patologie ad essa correlate, ma anche per lo sviluppo di possibili strategie terapeutiche, l'utilizzo di modelli sperimentali animali, soprattutto quelli di piccola taglia, può essere di grande aiuto. Nei roditori, per esempio, esistono diversi modelli di obesità: modelli genetici e modelli di obesità indotta da dieta. I più utilizzati appartenenti al primo gruppo sono i modelli con mutazioni geniche a carico della produzione (topi *ob/ob*) o della risposta (topi *db/db*, ratti *fa/fa* Zucker) alla leptina.

Modelli genetici di obesità

Topo ob/ob

Nel 1949, i ricercatori del Jackson Laboratory scoprirono per caso dei topi obesi (*Ingalls et al, 1950*). Il topo *ob/ob* presenta una mutazione spontanea missenso nel gene *ob* che codifica per la leptina; questa mutazione provoca l'inserimento di un codone di stop all'interno del codice di lettura che porta alla produzione di una proteina trunca che viene degradata all'interno dell'adipocita (*Zhang et al, 1994*). Il topo *ob/ob* quindi presenta una deficienza assoluta della produzione di leptina e, visto il ruolo che questa adipochina svolge nel regolare l'omeostasi del bilancio energetico, questi animali presentano iperfagia, obesità, diabete mellito di tipo 2, steatosi epatica ed insulino-resistenza. Alla nascita questi topi appaiono normali, ma a partire dai primi mesi (7-9 settimane) acquistano peso rapidamente, raggiungendo anche un peso che è superiore di tre volte rispetto a quello di un topo di controllo. Questi modelli sono ampiamente usati per lo studio dei meccanismi di azione della leptina ed anche per comprendere il metabolismo del glucosio e dei lipidi.

Topo db/db

Il modello del topo *db/db* mostra invece un'alterazione nel signaling della leptina in quanto presenta una mutazione puntiforme a livello del gene che codifica per il suo recettore. Un alterato signaling della leptina a livello ipotalamico porta ad una persistente iperfagia e ad obesità, con conseguente iperleptinemia, insulino-resistenza ed aumentati livelli di insulina. Ad un mese età questi topi sono obesi rispetto ai controlli (eterozigoti) e presentano un accumulo di grasso soprattutto nella regione ascellare ed inguinale; inoltre, a 8 settimane,

manifestano una marcata iperglicemia associata ad insulino-resistenza e quindi questi modelli sono molto utilizzati per lo studio del diabete mellito di tipo 2 (*Chen et al, 1996; Lee et al, 1996*).

Ratto fa/fa Zucker

Nel 1961 venne individuata una mutazione autosomica recessiva associata allo sviluppo di obesità, a carico del gene *fatty* sul cromosoma 5 (*Zucker & Zucker, 1961*) del ratto. I ratti che portano questa mutazione sono caratterizzati da iperfagia ed obesità ad esordio precoce, che compare all'età di 5 settimane sotto la forma di accumulo sottocutaneo di grasso. Questi animali mostrano inoltre una moderata insulino-resistenza, ma senza una progressione verso il diabete o disordini cardiovascolari. Come i topi *db/db* anche i ratti *fa/fa* presentano alterazioni a carico del recettore per la leptina e sono ampiamente usati come modello sperimentale per lo studio dell'obesità.

Modelli di obesità indotta dalla dieta

Nello studio dell'obesità una dieta ad alto contenuto calorico è spesso utilizzata per alimentare modelli sperimentali non leptino-deficienti. A seconda del modello animale utilizzato possono esserci differenze ceppo-specifiche nelle risposte che si manifestano in seguito ad una dieta grassa (*West et al, 1992*); in particolare, tra i modelli murini, il ceppo C57BL/6J è quello più ampiamente usato perché questi animali, quando alimentati con una dieta ad alto contenuto calorico, mostrano delle anomalie simili a quelle che caratterizzano la sindrome metabolica umana (*Collins et al, 2004*).

Modelli di interazione dieta-genotipo

Per una migliore comprensione dei meccanismi alla base di alterazioni metaboliche complesse come quelle che caratterizzano lo sviluppo di obesità e le sue complicanze, sempre più importanza acquista l'uso di modelli che cercano di indagare come un quadro genetico predisponente possa interagire con la componente ambientale legata, per esempio, al regime alimentare.

In questo quadro, un modello di studio molto interessante può essere rappresentato dal topo eterozigote *ob/+* (parzialmente deficiente nella produzione di leptina). A questo modello è stato riservato sino ad oggi scarso interesse in letteratura; tuttavia i topi *ob/+*, che in condizioni di dieta normocalorica non differiscono dai controlli, sono in grado di manifestare un fenotipo obeso ed insulino-resistente se sottoposti ad un regime alimentare con dieta ipercalorica ed iperlipidica. Il topo eterozigote *ob/+* ha quindi i presupposti per essere un ottimo modello per lo studio delle interazioni tra componente genetica ed abitudini alimentari.

Un ulteriore motivo di interesse verso questo modello è inoltre legato alle importanti implicazioni che esso può avere riguardo ai meccanismi di sviluppo di obesità nell'uomo. Infatti, se la completa deficienza di leptina nell'uomo è una condizione estremamente rara (*Friedman & Halaas, 1998*), un discreto numero di individui (circa il 15% della popolazione) mostra invece livelli di leptina ridotti (ma non nulli) come conseguenza di una mutazione in eterozigosi (*Farooqi et al, 2001*) o di un polimorfismo del gene *ob* (*Hoffstedt et al, 2002*).

Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi è quello di armonizzare le esperienze cliniche con le informazioni ricavate dagli studi sperimentali per una più completa analisi dei meccanismi alla base di alterazioni metaboliche complesse che concorrono allo sviluppo di obesità e delle sue complicanze. Da quanto esposto nei paragrafi precedenti si evince il ruolo chiave che la leptina esercita nel controllo del peso corporeo visto che tanto la sua assenza quanto gli alti livelli circolanti presenti nei casi di leptino-resistenza risultano associati ad un quadro patologico di obesità e sindrome metabolica. Per questo motivo abbiamo ritenuto interessante utilizzare per i nostri studi i topi *ob/+* (con parziale deficienza di leptina), nutriti con dieta ipercalorica e iperlipidica. In particolare, la combinazione di una predisposizione genetica con una insalubre abitudine alimentare potrebbe rappresentare un modello utile per lo studio delle patologie che hanno alla base disordini metabolici, comunemente osservati negli individui obesi. In quest'ottica, gli obiettivi del progetto sono stati:

- confrontare l'effetto di una dieta ad alto contenuto calorico e lipidico in topi C57BL/6 wild type ed in topi *ob/+* (con parziale deficienza di leptina), con particolare riguardo allo sviluppo di obesità, insulino-resistenza ed alterazioni della funzione cardiaca;
- valutare l'efficacia del trattamento con il peptide L-4F, mimetico dell'apolipoproteina A1, nel ridurre l'incremento di peso e le disfunzioni metaboliche e cardiovascolari associate ad un regime alimentare ipercalorico nei due diversi genotipi , wild type e *ob/+*.

Materiali e metodi

Animali e protocollo sperimentale

Tutte le procedure ed i protocolli sperimentali descritti e utilizzati nel presente studio sono stati eseguiti seguendo le linee guida nazionali dettate dal D.Lgs 116 (1992) e in modo conforme ai "Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings" approvato dal Consiglio della Società Fisiologica Americana (The American Physiological Society, 2002).

Gli esperimenti sono stati condotti su topi maschi C57BL6 wild-type (wt) e *ob/+* (B6 V-Lep *ob/+*, mutante del ceppo originale C57BL6) acquistati presso allevamenti conformi alle vigenti normative (Harlan, Italia) oppure allevati presso il Centro di Biomedicina Sperimentale (CBS) dell'Area della Ricerca CNR.

Genotipizzazione degli animali

Gli animali nati presso i nostri laboratori sono stati caratterizzati riguardo alla presenza degli alleli *ob* o wt del gene della leptina mediante procedure di genotipizzazione.

La tipizzazione per la variante del gene della leptina veniva effettuata per estrazione del DNA dalla coda di topo. Agli animali nati in loco presso il CBS di età compresa tra 4-5 settimane e sotto anestesia veniva prelevata la parte terminale della coda (circa 0.5 cm) mediante taglio e cauterizzazione del moncone di amputazione. Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il Kit EuroGold, Tissue DNA mini Kit® (*Euroclone* – Milano). Brevemente, il frammento di coda viene incubato con 400 µl di tampone di lisi, 20 µl di

proteinasi K e 15 µl di RNasi A (20 mg/ml) per circa 2 ore a 50°C. Al termine dell'incubazione il tessuto risulta completamente lisato. Eventuali debris e parti di tessuto non lisato sono eliminati mediante centrifugazione a 10000xg per 30 secondi. Al sopranatante viene aggiunto in proporzione 1:1 v/v il tampone di legame per DNA, la soluzione viene caricata su colonna e centrifugata a 10000xg per 1 minuto. Dopo due risciacqui con tampone di lavaggio il campione viene asciugato mediante centrifugazione a vuoto a 10000xg per 2 minuti e il DNA eluito incubando la colonna per 3 minuti con 200 µl di tampone di eluizione e centrifugando poi per 1 minuto a 1000xg.

Quantificazione di DNA

La quantità e la purezza del DNA sono valutati mediante lettura spettrofotometrica, considerando che 1 densità ottica (*Optical density*, OD) di DNA letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda, $\lambda = 260$ nm corrisponde a 50 µg. I campioni sono letti mediante spettrofotometro *NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer*, Celio S.p.A). Il grado di purezza è valutato mediante il rapporto tra valori di assorbanza A_{260}/A_{280} , e un valore > 1.6 è considerato appropriato.

Amplificazione

La sequenza dei primers selezionati è come segue:

F: 5' TCC AAG ATG GAC CAG ACT CT 3'

R: 5' AGG GAG CAG CTC TTG GAG AA 3'.

L'amplificazione viene eseguita in un volume finale di 25 µl, con primers forward (F) and reverse (R) alla concentrazione finale di 0.5 µM, dNTP 0.2 mM, buffer

10X, 0.5 U Taq (HotMaster Taq Prime, USA) e 500 ng di DNA. L'amplificazione è effettuata su una macchina Perkin Elmer 9600 (Perkin Elmer, USA). Dopo una iniziale denaturazione a 94 °C per 5' il gene di interesse è stato amplificato per 32 cicli di amplificazione (94 °C 30"; 59 °C 30"; 72 °C 30"), seguiti da 5' di allungamento finale a 72 °C. 5 µl dell'amplificato sono poi caricati su un gel di agarosio al 2%.

Restrizione

Per differenziare i frammenti amplificati degli alleli wt e *ob* è stato aggiunto un passaggio in enzima di restrizione. Infatti, il gene *ob* mutato ha un sito di restrizione per l'enzima *Ddel*. Il protocollo di restrizione è stato scelto seguendo le indicazioni di Hirasawa et al (1997). Dopo un'incubazione con 0.5 U di enzima, 8 µl di amplificato, 2 µl di buffer high salt e acqua (volume finale = 20 µl) per 3 ore, 12 µl del campione vengono caricati su un gel di agarosio al 4%. Mentre il frammento del gene wt ha una lunghezza di 140 bp, in seguito alla digestione enzimatica i frammenti digeriti dell'allele mutato *ob* hanno una lunghezza di 44 e 96 bp, rispettivamente.

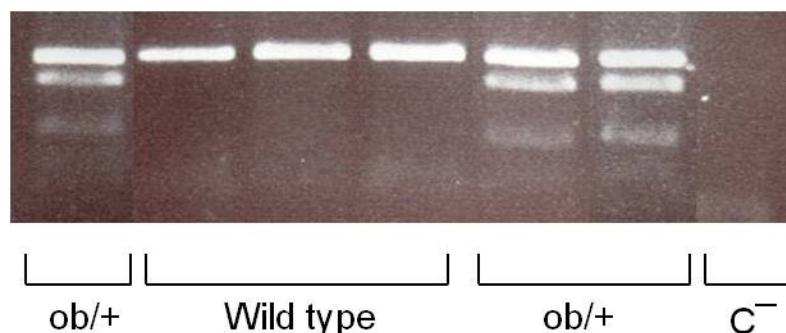


Figura 3. Esempio di corsa elettroforetica dei frammenti di restrizione

Protocollo sperimentale

Gli animali sono stati mantenuti in regime controllato di alternanza luce/buio di 12 ore, ad una temperatura costante di 21 ± 0.5 °C, con umidità relativa del $55 \pm 2\%$, e sono stati alimentati con una dieta standard e con libero accesso all'acqua fino all'età di 8-10 settimane. Successivamente, sia i topi wt che quelli del ceppo *ob/+* venivano suddivisi in due gruppi e nutriti per circa 4 mesi (18 settimane) o con dieta standard (DS, 2844 Kcal/kg, senza grassi di origine animale) o con dieta ad alto contenuto calorico in cui il 45% dell'apporto energetico deriva da grassi animali (HF, 4730 Kcal/kg, con un contenuto di colesterolo di 196,5 mg/kg).

I dettagli nutrizionali delle due diete sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Dettagli nutrizionali delle due diete utilizzate

Nutrienti	Dieta standard	Dieta High Fat
Proteine (Kcal%)	24	20
Carboidrati (Kcal%)	11	35
Grassi (Kcal%)	65	45
Colesterolo (mg/kg)	-	196,5
Totale (kcal/kg)	2844	4730

Dopo le prime 10 settimane di dieta ipercalorica (HF), gli animali del ceppo sia wt che *ob/+* sono stati a loro volta suddivisi in due sottogruppi: una parte di animali è stata trattata con il peptide mimetico dell'apolipoproteina A1 L-4F (Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂). Il peptide è stato dissolto in una soluzione di ammonio bicarbonato 100 mM, 0.01% TWEEN, pH 7.4, ed è stato

iniettato per via intraperitoneale ad una dose giornaliera pari a 2mg/kg di peso corporeo. Un'altra parte di topi è stata trattata con iniezioni intraperitoneali di soluzione fisiologica di pari volume. In entrambi i casi il trattamento è stato ripetuto per 5 giorni alla settimana per un totale di 8 settimane.

Il protocollo sperimentale seguito è schematizzato nella figura 4.

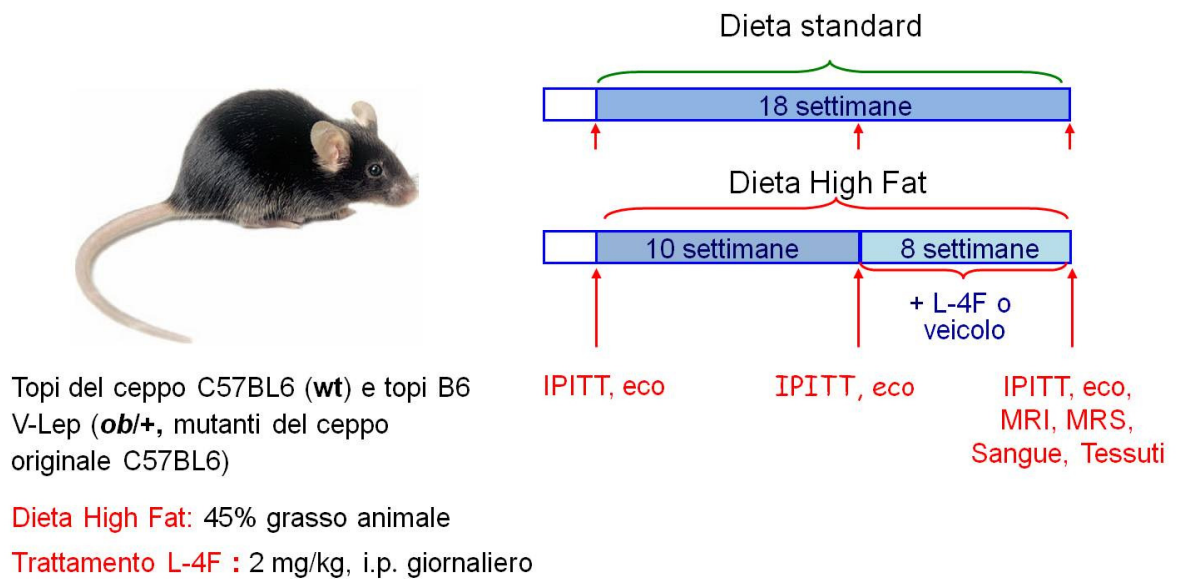


Figura 4. Schema del protocollo sperimentale

Per il nostro studio sono stati utilizzati 41 topi wild type e 41 topi *ob/+*. Il numero di animali e la loro allocazione nei protocolli *in vivo* ed *ex vivo* sono indicati nella tabella 2.

Tabella 2. Numero degli animali utilizzati per i diversi set sperimentali

	Dieta standard		Dieta High Fat			
	wt	ob/+	+ veicolo		+ L-4F	
			wt	ob/+	wt	ob/+
Peso animale e consumo dieta	15	15	15	15	11	11
Test di tolleranza all'insulina	15	15	15	15	11	11
Parametri plasmatici	15	15	15	15	11	11
Distribuzione VAT e SAT	10	10	10	10	8	8
Steatosi epatica	10	10	10	10	8	8
Ecocardiografia	10	10	10	10	8	8
Analisi espressione WB	6	6	6	6	6	6

Per tutti i gruppi di animali wt e ob/+ è stato valutato il guadagno di peso corporeo al termine del periodo di dieta normo- od ipercalorica, in assenza o in presenza del trattamento con L-4F. Inoltre, per ciascuna condizione di regime dietetico e trattamento, è stato misurato l'apporto energetico giornaliero (in kcal), la quantità di colesterolo ingerito, ed i valori della "feed efficiency" (incremento in peso per kcal introdotta) di ogni gruppo di animali.

Test di tolleranza all'insulina

La sensibilità all'insulina è stata misurata mediante il test di tolleranza insulinica (IPITT) all'inizio dello studio, dopo le prime 10 settimane di dieta (prima dell'inizio del trattamento) ed al termine delle 8 settimane di trattamento con il peptide L-4F.

Il test è stato eseguito mediante iniezione intraperitoneale di una quantità di insulina Humulin R pari a 1,2 U/Kg di peso corporeo, in topi svegli e a digiuno da 6 ore. La misurazione del livello di glicemia veniva effettuata con il metodo della glucosio ossidasi (Glucocard GT-1610, Menarini Diagnostic, Firenze, Italia) su una goccia di sangue ottenuta mediante venipuntura della coda, prima (condizione basale) e dopo 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minuti dall'iniezione di insulina. Per ciascun animale le misure di glicemia sono state quindi riportate in grafico in funzione del tempo ed è stata calcolata l'area sotto la curva (AUC) secondo la regola dell'area trapezoidale (figura.5).

Il protocollo utilizzato era conforme alle linee guida suggerite da "Animal Models of Diabetic Complications Consortium", USA.

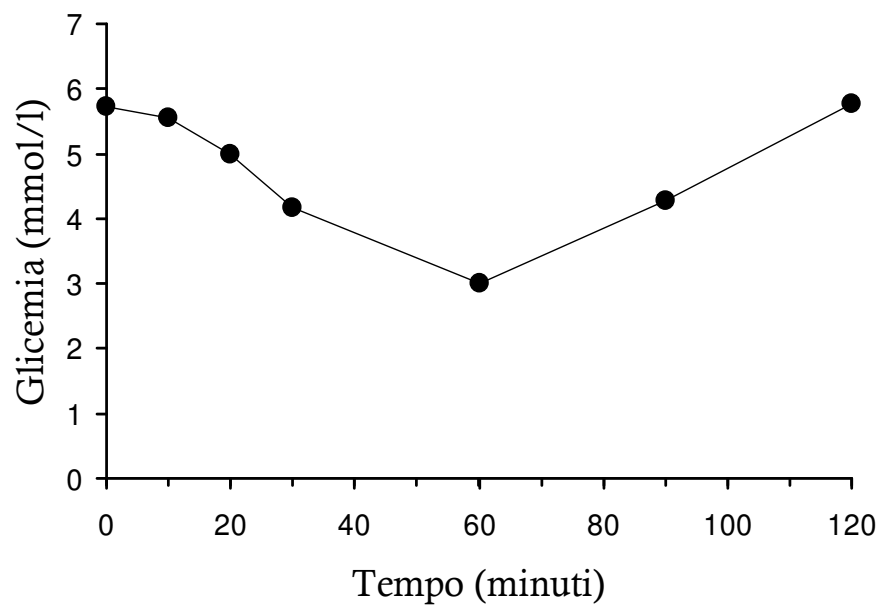


Figura 5. Grafico rappresentativo dell'andamento dei livelli glicemici in funzione del tempo, ottenuto mediante il test di tolleranza all'insulina in un animale wt

Analisi dei parametri plasmatici

Al termine del periodo sperimentale sono stati raccolti campioni di sangue in topi anestetizzati con iniezione intraperitoneale di Pentobarbital (40mg/kg). I campioni sono stati immediatamente centrifugati (5000 x g per 10 minuti) ed il plasma è stato conservato a -20°C. I campioni sono stati utilizzati per le successive analisi dei valori glicemici, del profilo lipidico (colesterolo e trigliceridi) e degli enzimi indicatori della funzione epatica, quali aspartato transaminasi (AST), alanina transaminasi (ALT) e γ -glutammina-transferasi (γ GT). Le analisi sono state eseguite utilizzando un analizzatore automatico (Vet Test,

IDEXX Laboratories Italia, Milano). Inoltre, è stata effettuata la quantificazione dei livelli plasmatici di insulina, leptina, adiponectina e interleuchina-6 (IL-6) mediante specifici saggi ELISA. Sono stati impiegati i seguenti kit commerciali: Ultra sensitive Insulin ELISA kit (Crystal Chem Inc., USA), Mouse Leptin EIA kit (Assay Designs, Stressgen, USA), Adiponectin (mouse) ELISA kit (AdipoGen Inc., Korea), IL-6 (mouse) EIA kit (Enzo Life Sciences, USA).

Imaging in Risonanza Magnetica (MRI)

Alla fine del protocollo sperimentale gli animali sono stati sottoposti ad indagini non invasive di imaging mediante risonanza magnetica (MRI) per la valutazione del grasso sottocutaneo (SAT) e viscerale (VAT). Per le sedute di imaging gli animali sono stati anestetizzati con iniezione intraperitoneale di Pentobarbital (30mg/kg) per consentire un'adeguata ricostruzione delle immagini in assenza di artefatti dovuti al movimento dell'animale. Le immagini MRI erano acquisite mediante apparecchiatura scanner General Electric (GE) Excite 1.5 Tesla, utilizzando una bobina ad uso diagnostico umano per testa-collo a sequenza pulsata (spin-echo) ed imaging a contrasto T1, con dimensione dell'immagine di 224x192 pixels. Le immagini venivano acquisite secondo un gradiente assiale che copriva l'intero volume toracico ed addominale con sezioni dello spessore di 3 mm, senza soluzione di continuità.

Le immagini acquisite venivano successivamente processate per la segmentazione semiautomatica del tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) e viscerale (VAT) utilizzando il programma di analisi HIPPO FAT che forniva dati sul volume totale analizzato (inclusi anche il tessuto scheletrico e i tessuti molli),

il grasso totale, i volumi di SAT e VAT separatamente, il rapporto VAT/SAT e il rapporto grasso/volume totale (figura 6).

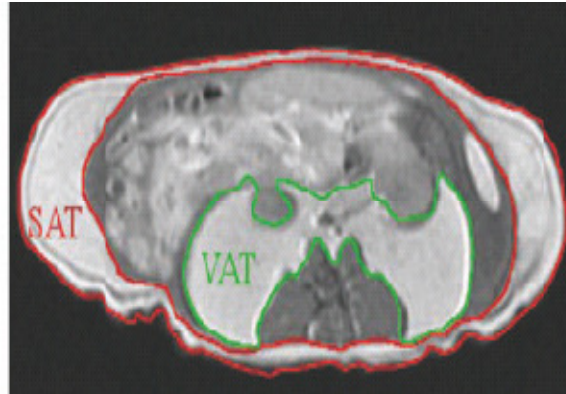


Figura 6. Sezione trasversale dell'addome di topo ottenuta mediante risonanza magnetica in cui sono state circoscritte le aree del tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) in rosso e di quello viscerale (VAT) in verde.

Spettroscopia in Risonanza Magnetica (MRS)

Per valutare l'accumulo di lipidi nel fegato (steatosi epatica), parametro considerato un importante indice di rischio per le complicanze cardiovascolari associate alle sindromi metaboliche, è stata effettuata l'analisi spettrale del grasso epatico mediante Spettroscopia in Risonanza Magnetica (localized proton magnetic resonance spectroscopy) ottenuta mediante apparecchiatura scanner General Electric (GE) Excite 1.5 Tesla, precedentemente descritta. Per l'acquisizione spettroscopica veniva scelta la sezione assiale in cui il fegato appariva in dimensioni maggiori e la quantificazione dell'acqua e del grasso veniva eseguita mediante sequenza spettroscopica a risoluzione puntuale.

Negli spettri ottenuti venivano identificati i picchi dell'acqua e quello dei lipidi rispettivamente ai punti 0 e -3.77 dello spostamento chimico, espresso come

parti per milione (ppm) della frequenza di risonanza. La quantificazione del contenuto lipidico del fegato veniva calcolata come rapporto tra la curva del grasso e quella dell'acqua. I dati della spettroscopia sono stati analizzati mediante il programma jMRUI-4.0.

Ecocardiografia

Per valutare lo stato di funzionalità ventricolare nei due ceppi di topi, nei diversi regimi dietetici e, eventualmente, in presenza o meno di trattamento farmacologico, per ogni animale è stato acquisito un imaging ecocardiografico cardiaco in diverse fasi del periodo sperimentale, come indicato nello schema riportato in figura 4. Le sedute di ecocardiografia trans-toracica bidimensionale (2D) sono state eseguite in animali sotto anestesia (Pentobarbital 20mg/kg i.p.) e mantenuti in posizione supina, mediante un sistema portatile ad ultrasuoni (MyLab 25, Esaote SpA, Genova, Italia) dotato di un trasduttore lineare ad alta frequenza (LA523, 12.5 MHz). Sono state ottenute immagini bidimensionali in asse corto a livello dei muscoli papillari del ventricolo sinistro (LV) dalle quali sono state derivate le misure degli spessori parietali e i diametri della camera ventricolare sia in telediastole che in telesistole. I parametri sono stati calcolati sulla media di misure ottenute in tre cicli cardiaci consecutivi. La funzione sistolica è stata espressa come percentuale della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (% FS) e l'indice di contrattilità della parete ventricolare come percentuale di ispessimento sistolico delle pareti (LVWT).

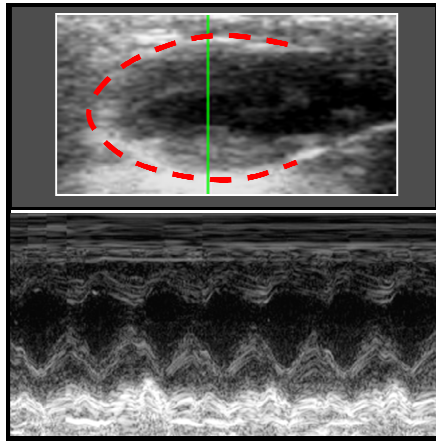


Figura 7. Esempio di immagine ecocardiografica di un cuore di topo wt. In alto è riportata un'immagine bidimensionale ottenuta in asse lungo e in basso il profilo M-mode riferito al piano indicato dalla linea verde nel pannello superiore.

Analisi di espressione proteica

Preparazione e quantificazione dei campioni cardiaci

Al termine del periodo sperimentale gli animali sono stati sacrificati mediante dose letale di anestetico ed i cuori sono stati prelevati, congelati rapidamente in azoto liquido e quindi conservati a -80°C . Successivamente i tessuti sono stati omogenati in un tampone di lisi contenente: K_2HPO_4 10 mM, saccarosio 250 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 0.5% (pH 7.4). Al momento dell'utilizzo è stato aggiunto PMSF 0.2 mM (inibitore delle serin-proteasi), insieme ad un mix di inibitori di diverse proteasi e fosfatasi (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific), comprendente leupeptina, pepstatina, aprotinina, sodio fluoruro, sodio ortovanadato, sodio pirofosfato e β -glicerofosfato. Dopo aver pesato il campione, è stato aggiunto un quantitativo di tampone pari a 1 ml per circa 100 mg di campione. L'omogeneizzazione dei campioni è stata

ottenuta con il metodo Tissue Lyser (Qiagen®), che permette l'applicazione di vibrazioni ad alta velocità. E' stato impiegato un protocollo che prevedeva 2 cicli ad una frequenza di 25 Hz per 2 minuti. Gli omogenati sono stati successivamente centrifugati a 2500xg per 10 minuti a 4°C ed i sovranatanti sono stati recuperati, aliquotati e congelati a -80°C, ad eccezione di un'aliquota di 50µl che è stata conservata a 4°C per misurare la concentrazione proteica con il saggio dell'acido bicinconinico (BCA protein assay kit, Pierce, Rockford, IL).

Questo metodo di quantificazione combina la riduzione del Cu^{2+} a Cu^{1+} in seguito all'interazione con i legami peptidici delle proteine in un mezzo alcalino con la rivelazione colorimetrica, altamente sensibile e selettiva, del catione Cu^{1+} con l'acido bicinconinico. Nella prima fase della reazione lo ione Cu^+ forma un complesso di coordinazione con gli atomi coinvolti nel legame peptidico, che presenta una debole colorazione blu-violetta, la cui intensità è proporzionale al numero di legami peptidici presenti. Nella seconda fase, due molecole di acido bicinconinico (BCA) si legano ad uno ione Cu^+ , che si è prodotto nel primo passaggio, formando un complesso Cu^+ -BCA che sviluppa un intenso color porpora. Questo passaggio aumenta di circa 100 volte la sensibilità del saggio. Il complesso così ottenuto è solubile in acqua e presenta un picco di assorbimento a 562 nm, direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine. Per ogni determinazione venivano inoltre usati anche campioni standard a concentrazione nota di albumina serica di origine bovina (BSA), sui quali è stata costruita una curva di taratura. I valori delle concentrazioni proteiche degli omogenati cardiaci sono stati calcolati intercalando il valore di

assorbanza ottenuto per ciascuno dei campioni sulla retta di regressione ottenuta mediante la curva di taratura.

Western Blot

Per l'analisi dell'espressione proteica è stata utilizzata la tecnica del Western Blot. I campioni sono stati preparati in una soluzione Sample Buffer 3x (Tris HCl 100mM, glicerolo 30%, SDS 3%, blu di bromofenolo 0,015%) con l'aggiunta di ditiotreitolo (DDT) 300 mM e successivamente bolliti a 95°C per 5 minuti e conservati a -20°C.

In seguito i campioni proteici sono stati separati per mezzo di elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). Il gel per la separazione delle proteine è costituito da due parti:

- “upper gel” alla concentrazione fissa del 4% (ottenuta miscelando opportunamente soluzioni di acrilammide 40%, bis-acrilammide 2%, Tris-HCl 0,5 M pH 6.8, in presenza di SDS 0,1%, e di TEMED e APS come catalizzatori della reazione);
- “lower gel” alla concentrazione variabile del 7,5-9% (ottenuto miscelando acrilammide 40%, bis-acrilammide 2% e Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, in presenza di SDS 0,1%, TEMED e APS).

Dopo aver caricato i campioni (20-25µg) ed il marker (10µl) nei vari pozzetti, la corsa elettroforetica è effettuata in tampone Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (pH 8.3), preparato da una soluzione madre 10x (Biorad #161-0772), ad un voltaggio costante di 200 Volt, per un tempo di circa 50 minuti. Dopo la separazione le proteine sono trasferite dal gel ad una membrana di PVDF

(Amersham Hybond-P, GE Healthcare), mediante un processo di trasferimento elettrico. Per far avvenire il trasferimento il gel e la membrana sono montati in stretta adesione in un "sandwich" in tampone Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8.3) (Biorad #161-0771), mentre viene applicato un voltaggio di 100 Volt, ad un'intensità di corrente costante di 350 mA, per un tempo di 2 ore.

Per verificare l'avvenuto trasferimento la membrana è colorata con Rosso Ponceau, per 10 minuti, decolorata in acqua distillata e acquisita tramite scanner. Successivamente la membrana viene bloccata per 2 ore con una soluzione di latte al 5% in tween-TBS per impedire il legame degli anticorpi a siti aspecifici. La membrana è poi incubata con un anticorpo primario specifico per tutta la notte a 4 °C.

Infine, dopo gli opportuni lavaggi e l'incubazione con un anticorpo secondario coniugato con HRP (horseradish peroxidase) per 1 ora a temperatura ambiente, la rivelazione del legame dell'anticorpo è stata effettuata mediante reazione di chemiluminescenza (LiteAblot Extend, Euroclone) e successivo sviluppo su lastra fotografica (CL-X Posure Film, Pierce). Dopo acquisizione delle immagini mediante scanner, è stata valutata la densitometria delle bande tramite il programma di analisi Image J (National Institute of Health, USA).

In particolare sono stati saggiati, nel tessuto cardiaco, i livelli di espressione e di fosforilazione di alcune proteine coinvolte nel metabolismo energetico: tra queste il recettore dell'insulina (IR), e le chinasi AMPK ed AKT. La proteina GAPDH è stata impiegata come riferimento per la quantificazione dei livelli di espressione.

Gli anticorpi primari che abbiamo utilizzato sono: anticorpo anti-AKT (#9272, Cell Signaling Technology®), anticorpo anti-pAKT (Ser 473) (#4058, Cell

Signaling Technology[®]), anticorpo anti-pAMPK α (Thr 172) (#2531, Cell Signaling Technology[®]), anticorpo anti-AMPK α (#2532, Cell Signaling Technology[®]), anticorpo anti-IR β (#3020, Cell Signaling Technology[®]), anticorpo anti-pIR β (Tyr 1150/1151) (#3024, Cell Signaling Technology[®]), anticorpo anti-GAPDH (# 2118, Cell Signaling Technology[®]).

Come marker è stato utilizzato Prestained Protein Marked (#7720, Cell Signaling Technology[®]). Gli anticorpi secondari utilizzati sono i seguenti: anti mouse-HRP (Cell Signaling Technology[®]) e anti rabbit-HRP (Cell Signaling Technology[®]).

L'utilizzo sia degli anticorpi primari che di quelli secondari sui campioni sperimentali è stato preceduto da una serie di prove per la messa a punto delle migliori diluizioni ai fini dell'applicazione pratica sui tessuti e nelle condizioni da noi impiegate.

Analisi statistica

I dati riportati nel presente studio sono espressi come media \pm errore standard. Il confronto statistico fra quattro gruppi è stato condotto mediante analisi della varianza (ANOVA) a due vie, considerando il genotipo (wt o *ob/+*) e la dieta (SD o HF) o il trattamento in HF (fisiologica o L-4F) come fattori principali. Il confronto fra due gruppi è stato eseguito mediante ANOVA ad una via. Il test di Fisher o lo Student's t-test per dati non appaiati venivano utilizzati come *post hoc* test. Per ciascuna valutazione è stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il programma MedCalc, versione 7.2.1.

Risultati

Effetti sul peso corporeo, sull'intake energetico e sulla "feed efficiency"

Durante lo studio, i due gruppi di animali, wt e *ob/+*, sono stati nutriti con dieta normocalorica (DS) o con dieta ipercalorica (HF). Per valutare se la dieta avesse un effetto diverso in base al genotipo, abbiamo misurato alcuni parametri relativi al peso, all'introito calorico (in kcal/die), alla quantità di colesterolo ingerito giornalmente e alla "feed efficiency" (ovvero l'aumento in peso corporeo per ogni kcal assunta) riferiti al periodo di studio di 18 settimane. Inoltre, nel sottogruppo di animali wt e *ob/+* a regime alimentare ipercalorico, è stato valutato l'effetto del trattamento con il peptide L-4F protratto nelle ultime 8 settimane dello studio. I dati raccolti sono riportati nella tabella 3.

I dati mostrano come in condizioni di dieta standard i due ceppi di animali non differiscono in termini di guadagno di peso corporeo: infatti, i topi wild type ed *ob/+* nutriti con dieta normocalorica hanno acquistato, rispettivamente, 6.8 ± 0.3 e 7.3 ± 0.4 grammi di peso nelle 18 settimane di studio. Nessuna differenza è stata riscontrata anche per quanto riguarda l'intake energetico giornaliero e la "feed efficiency".

Tabella 3. Caratteristiche generali dei diversi gruppi di animali

	Dieta standard		Dieta High Fat			
	wt	ob/+	+ veicolo		+ L-4F	
			wt	ob/+	wt	ob/+
			n=15	n=15	n=11	n=11
Guadagno di peso corporeo (g)	6.8 ± 0.3	7.3 ± 0.4	13.6 ± 0.7*	18.8 ± 1.4*§	12.6 ± 0.7*	13.5 ± 1.5*#
Introito calorico (kcal/die)	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.1	11.7 ± 0.2*	13.5 ± 0.3*§	10.6 ± 0.2*	11.7 ± 0.3*#
Colesterolo assunto (mg/die)	n.d.	n.d.	0.49 ± 0.06	0.56 ± 0.03	0.44 ± 0.06	0.49 ± 0.04
Feed efficiency (mg/kcal)	5.7 ± 0.5	6.1 ± 0.3	8.3 ± 0.5*	11.1 ± 0.8*§	8.4 ± 0.5*	9.1 ± 1.0*#

*P<0.05 vs dieta standard; §P<0.05 vs wild type in dieta HF, trattamento con veicolo; #P<0.05 vs dieta HF, trattamento con veicolo

In dieta High Fat, come atteso, si osserva per entrambi i ceppi un aumento significativo nel guadagno del peso corporeo, dell'apporto energetico giornaliero e della "feed efficiency" ($p<0.05$). In più, negli animali eterozigoti *ob/+* la condizione di parziale deficienza di leptina produce un evidente effetto additivo rispetto a quello dato dalla sola dieta ipercalorica: in confronto agli animali wt, i topi *ob/+* manifestano, infatti, un maggiore incremento del peso corporeo (18.8 ± 1.4 vs 13.6 ± 0.7 g, $p<0.05$), dell'apporto energetico giornaliero (13.5 ± 0.3 vs 11.7 ± 0.2 kcal/die, $p<0.05$) e della "feed efficiency" (incremento in peso per kcal introdotta, 11.1 ± 0.8 vs 8.3 ± 0.5 mg/kcal, $p<0.05$).

Per quanto concerne il trattamento con il peptide L-4F, questo non sembra incidere significativamente sugli animali wt, i quali mantengono valori simili a quelli osservati in presenza della sola dieta HF per tutti i diversi parametri

valutati. Viceversa, negli animali *ob/+*, il trattamento con L-4F è in grado di ridurre significativamente sia il guadagno di peso (13.5 ± 1.5 g, $p < 0.05$ rispetto agli *ob/+* HF senza trattamento) che l'introito calorico (11.7 ± 0.3 kcal/die, $p < 0.05$) e la "feed efficiency" (9.1 ± 1.0 mg/kcal, $p < 0.05$). Nei topi *ob/+*, quindi, il trattamento con il peptide apoA1-mimetico sembra revertire gli effetti avversi dati dall'interazione tra componente genetica e dieta ipercalorica, essendo in grado di riportare i valori dei parametri analizzati ai livelli osservati negli animali wt con dieta HF.

Effetti sui parametri plasmatici e sui marcatori di funzionalità epatica

Al termine del periodo sperimentale i campioni di sangue raccolti dai diversi animali sono stati utilizzati per le analisi dei valori glicemici, del profilo lipidico (colesterolo e trigliceridi) e degli enzimi indicatori della funzione epatica, quali aspartato transaminasi (AST), alanina transaminasi (ALT) e γ -glutammiil-transferasi (γ GT). Nella tabella 4 sono riportati i parametri plasmatici che sono stati dosati nei due ceppi di topi e nelle diverse condizioni di dieta e trattamento.

Tabella 4. Parametri plasmatici

	Dieta standard		Dieta High Fat			
	wt	ob/+	+ veicolo		+ L-4F	
			wt	ob/+	wt	ob/+
			n=15	n=15	n=11	n=11
Glucosio (mmol/l)	8.3 ± 0.4	8.3 ± 0.5	10.3 ± 0.7*	14 ± 0.9*§	10.2 ± 0.9	10.2 ± 0.7#
Colesterolo (mg/dl)	59 ± 9	74 ± 6	162 ± 17*	204 ± 14*§	169 ± 12*	120 ± 13*##
Trigliceridi (mg/dl)	49 ± 9	51 ± 10	66 ± 11*	75 ± 13*§	142 ± 17*##	95 ± 11*
AST (U/l)	120 ± 18	144 ± 22	295 ± 48*	236 ± 55*	410 ± 56*	285 ± 36*
ALT (U/l)	100 ± 15	78 ± 15	243 ± 47*	251 ± 30*	217 ± 20*	160 ± 12#
γGT (U/l)	7 ± 2	8 ± 1	8 ± 1	13 ± 1*§	9 ± 2	10 ± 1#

*P<0.05 vs dieta standard; §P<0.05 vs wild type in dieta HF, trattamento con veicolo; #P<0.05 vs dieta HF, trattamento con veicolo; ## P<0.001 vs dieta HF, trattamento con veicolo. In rosso sono evidenziati i valori che risultano al di fuori del range di riferimento per la specie murina.

In regime di dieta standard, gli animali *ob/+* non differiscono dai wt riguardo ai parametri ematici analizzati.

In presenza di dieta ipercalorica, si osserva per entrambi i ceppi di animali un aumento significativo di tutti i parametri (p<0.05), ad eccezione della γGT nei wt. Anche in questo caso la parziale deficienza di leptina negli animali *ob/+* si somma agli effetti della dieta ipercalorica determinando aumenti dei livelli di glucosio (14 ± 0.9 mmol/l), di colesterolo (204 ± 14 mg/dl), di trigliceridi (75 ± 13

mg/dl) e γ GT (13 ± 1 U/l) significativamente superiori rispetto a quelli degli animali wt ($p < 0.05$).

Di nuovo, il trattamento con L-4F si dimostra capace di ridurre i valori di molti di questi parametri nei topi *ob/+*. In particolare, si registrano riduzioni significative di glucosio (10.2 ± 0.7 mmol/l), di colesterolo (120 ± 13 mg/dl), di ALT (160 ± 12 U/l) e di γ GT (10 ± 1 U/l) rispetto agli *ob/+* non trattati ($p < 0.05$). E' da notare che per quanto riguarda i valori di glucosio e di γ GT, questi vengono addirittura riportati dal trattamento all'interno del range di normalità.

Effetti sui livelli plasmatici di insulina, leptina, adiponectina e interleuchina-6

Utilizzando i campioni plasmatici raccolti al termine del periodo sperimentale, è stato possibile effettuare specifici saggi ELISA per la quantificazione dei livelli plasmatici di molecole coinvolte nella regolazione del bilancio energetico, quali insulina, leptina ed adiponectina, e di uno tra i più importanti markers infiammatori, l'interleuchina-6 (IL-6).

Nella tabella 5 sono riportati i valori di queste molecole, dosate nei due ceppi di animali e nelle diverse condizioni di dieta e trattamento.

Tabella 5. Livelli plasmatici di ormoni e citochine

	Dieta standard		Dieta High Fat			
	wt	ob/+	+ veicolo		+ L-4F	
			wt	ob/+	wt	ob/+
			n=15	n=15	n=11	n=11
Insulina (ng/ml)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3	2.6 ± 0.4*	3.7 ± 0.8*§	2.4 ± 0.1*	2.4 ± 0.3*#
Leptina (pg/ml)	2 ± 0.4	3 ± 0.2	47 ± 8*	26 ± 4.3*§	32 ± 2*	28 ± 4*
Adiponectina (µg/ml)	38 ± 3	28 ± 1°	33 ± 2	27 ± 1 §	42 ± 3#	27 ± 2
IL-6 (pg/ml)	8.7 ± 0.8	12 ± 5	21 ± 6*	85 ± 20*§	20 ± 7	15 ± 2#

*P<0.05 vs. dieta standard; §P<0.05 vs wild type in dieta HF, trattamento con veicolo; #P<0.05 vs dieta HF, trattamento con veicolo; °P<0.05 vs wild type dieta standard.

In condizioni di dieta standard, gli animali *ob/+* non differiscono dai wt per i parametri analizzati ad eccezione dei livelli di adiponectina, che risultano sempre significativamente minori negli animali *ob/+* (p<0.05).

In regime di dieta iperlipidica i livelli di insulina risultano significativamente aumentati in entrambi i ceppi rispetto al regime dietetico standard, ma con un incremento maggiore nel ceppo *ob/+* rispetto a quello wt (3.7 ± 0.8 vs 2.4 ± 0.3 ng/ml, p<0.05). Con questo tipo di dieta e con il conseguente accumulo di grasso, anche i valori plasmatici di leptina risultano aumentati in entrambi i gruppi di animali. Il ceppo *ob/+*, in virtù della condizione di eterozigosi del gene della leptina disfunzionante, non è però in grado di produrre l'adipochina nelle quantità richieste dal regime alimentare ipercalorico: i livelli di leptina negli

animali *ob/+* risultano infatti all'incirca la metà di quelli dei wt (26 ± 4.3 pg/ml vs 47 ± 8 pg/ml, $p < 0.05$).

Per quanto riguarda l'adiponectina la dieta High Fat ne riduce i livelli negli animali wt, anche se non in modo significativo, mentre non ne altera i livelli negli animali *ob/+*, che comunque risultano sempre inferiori a quelli del genotipo wild type (27 ± 1 vs 33 ± 2 μ g/ml dei wt in dieta HF, $p < 0.05$).

Da rimarcare è l'innalzamento dei livelli plasmatici di interleuchina-6 in regime di dieta High Fat: in particolare, questo marker infiammatorio risulta notevolmente aumentato negli animali *ob/+* rispetto al genotipo nativo (85 ± 20 vs 21 ± 6 pg/ml dei wt in dieta HF, $p < 0.05$).

Come già osservato per altri parametri, il trattamento farmacologico con L-4F sembra agire in maniera differenziale sui due genotipi. Per quanto riguarda i wt, il trattamento riduce l'eccesso di secrezione di leptina, indotta dal regime ipercalorico, portando all'annullamento delle differenze tra i due ceppi (32 ± 2 pg/ml vs 28 ± 4 pg/ml negli *ob/+*); inoltre determina un aumento dei livelli di adiponectina (42 ± 3 μ g/ml).

Per quanto riguarda gli animali eterozigoti, il trattamento con L-4F annulla l'effetto del genotipo sui livelli di insulina, riportandoli a valori simili a quelli degli animali wild type. Inoltre l'impiego del peptide ApoA1-mimetico riduce i valori di IL-6 (15 ± 2 pg/ml) a livelli paragonabili a quelli degli stessi *ob/+*, in condizione di dieta standard.

Effetti sulla resistenza all'insulina

La sensibilità all'insulina è stata valutata nei due gruppi di animali mediante il test di tolleranza insulinica (IPITT) effettuato prima del periodo di studio, ad un tempo intermedio di 10 settimane e alla fine delle 18 settimane, sia in regime di dieta standard che di quella High Fat, quest'ultima tanto in assenza che in presenza del trattamento con il peptide L-4F. I risultati sono espressi come istogrammi relativi all'area sottesa alla curva IPITT (vedi sezione Metodi).

Come illustrato in figura 8, in condizioni di dieta standard il test di tolleranza all'insulina non evidenzia differenze significative tra gli animali wt e gli *ob/+*. Al contrario, già a 10 settimane di dieta ipercalorica il ceppo *ob/+* sviluppa una ridotta sensibilità all'insulina ($p < 0.01$ vs *ob/+* in dieta standard), effetto che invece non si osserva nei wt. La dieta ipercalorica quindi mette in evidenza una forte interazione tra regime dietetico e genotipo ($p < 0.01$, *ob/+* vs wt in dieta HF).

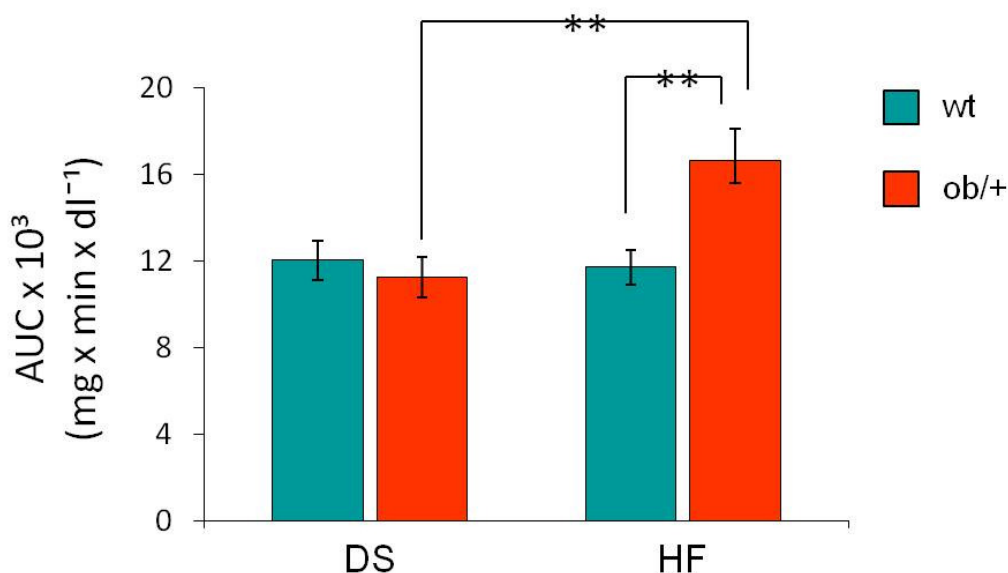


Figura 8. Sensibilità all'insulina dopo 10 settimane di dieta ($p < 0.01$).**

Alla fine delle successive 8 settimane di dieta High Fat, entrambi i ceppi di animali trattati con la soluzione di veicolo confermano gli stessi valori di risposta al carico di insulina precedentemente misurati, rimarcando ancora la differenza di sensibilità tra topi wt e *ob/+*, a sfavore di questi ultimi ($p < 0.01$). Al contrario, in seguito al trattamento con il peptide L-4F, gli animali *ob/+* mostravano un netto recupero della sensibilità insulinica, riportando i valori dell'istogramma a livelli simili a quelli degli animali wt e revertendo completamente l'effetto dell'interazione tra genotipo e dieta ipercalorica (figura 9).

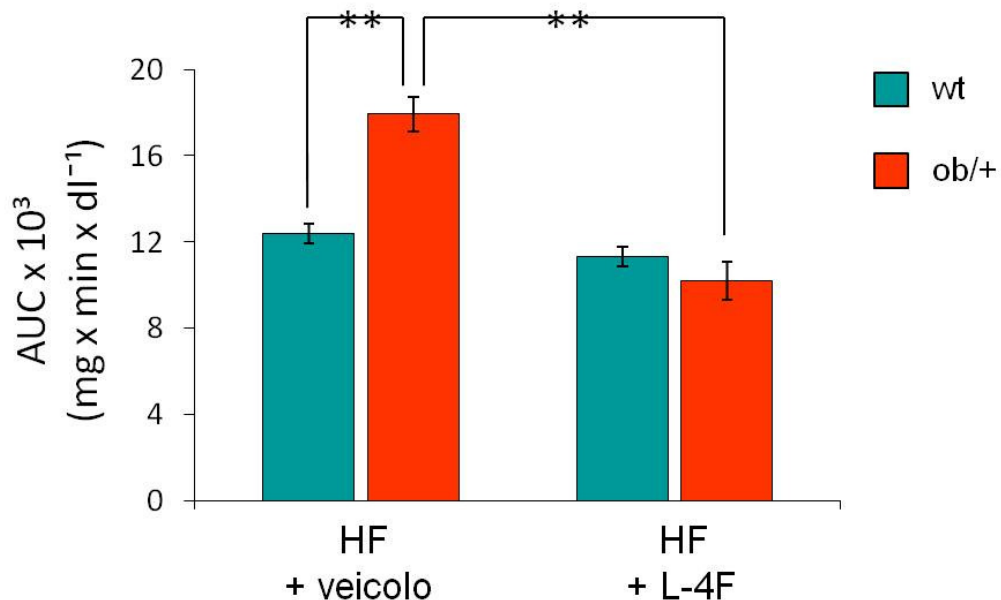


Figura 9. Sensibilità all'insulina dopo 18 settimane di dieta High Fat in presenza e in assenza di trattamento con L-4F ($p < 0.01$).**

Effetti sull'accumulo di grasso addominale

Per la quantificazione del grasso addominale totale, sottocutaneo (SAT) e viscerale (VAT) alla fine delle 18 settimane di studio gli animali sono stati sottoposti ad indagini di imaging in risonanza magnetica.

Per quanto riguarda il contenuto di grasso addominale totale non sono state rilevate differenze tra i due ceppi *wt* e *ob/+* in regime di dieta standard ($28.7 \pm 2.3\%$ vs $28.4 \pm 2.1\%$). Al contrario, dopo 18 settimane di dieta HF si evidenzia un accumulo di grasso addominale in entrambi i ceppi, con un incremento maggiore negli animali *ob/+* ($52.7 \pm 0.1\%$ vs $49.9 \pm 0.6\%$ nei *wt*, $p < 0.05$). Il trattamento con L-4F determina una significativa riduzione della percentuale di grasso addominale nei topi eterozigoti per il gene della leptina ($44.5 \pm 1.3\%$, $p < 0.01$, *ob/+* HF vs *ob/+* HF + L-4F), mentre non mostra alcun effetto nei *wt* ($48.4 \pm 2.0\%$), suggerendo una specificità di azione del peptide su vie di signaling che risultano alterate nella condizione di deficienza di leptina.

Le differenze osservate nel contenuto di grasso addominale totale sembrano dipendere soprattutto dalle variazioni del tessuto adiposo sottocutaneo (SAT) (figura 10). Anche in questo caso, le differenze tra i due genotipi, assenti in regime di dieta standard, si evidenziano dopo 18 settimane di dieta High Fat, indicando un incremento significativamente maggiore negli animali *ob/+* ($25.4 \pm 1\%$) rispetto agli animali wild type ($23.5 \pm 0.4\%$) ($p < 0.05$). Il trattamento con L-4F riduce in modo significativo la percentuale di grasso sottocutaneo negli *ob/+* ($18.9 \pm 0.7\%$ *ob/+* HF+L-4F vs $25.4 \pm 1\%$ *ob/+* HF, $p < 0.01$), mentre nei *wt* si osserva solo una lieve riduzione, non significativa, del contenuto di tessuto adiposo sottocutaneo.

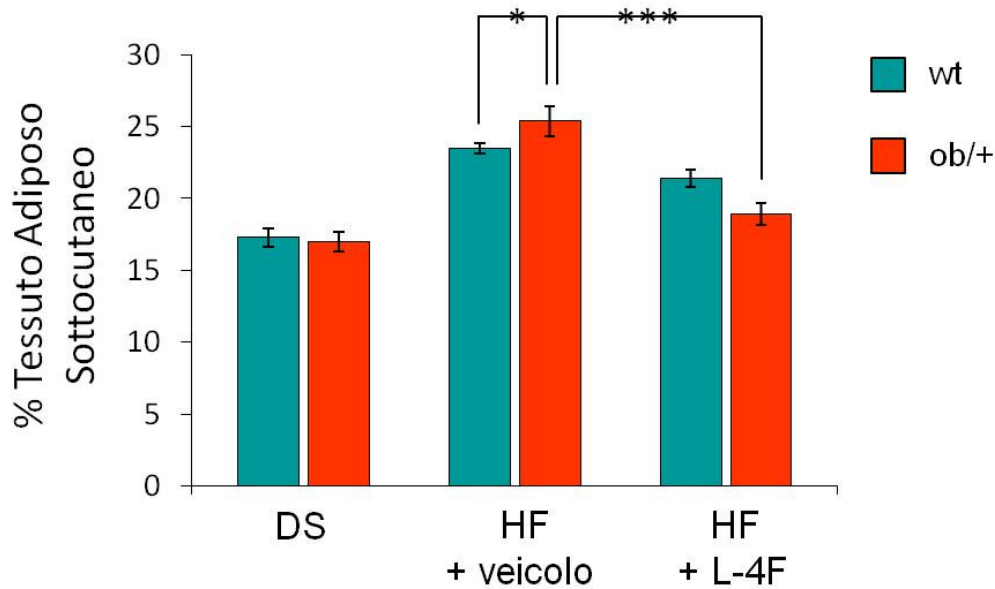


Figura 10. Percentuale del tessuto adiposo sottocutaneo (* $p<0.05$; * $p<0.001$).**

Per quanto riguarda il contenuto di grasso viscerale non si evidenziano invece differenze significative tra i due ceppi wt e *ob/+* sia in regime di dieta standard ($11.3 \pm 0.94\%$ vs $10.5 \pm 0.15\%$) sia in regime di dieta HF ($26.5 \pm 1\%$ vs $26.3 \pm 0.6\%$), dove i valori risultano in ugual modo significativamente aumentati ($p<0.001$). Il trattamento con il peptide L-4F non determina variazioni significative del contenuto di grasso viscerale rispetto alla sola dieta High Fat, per entrambi i ceppi (figura 11).

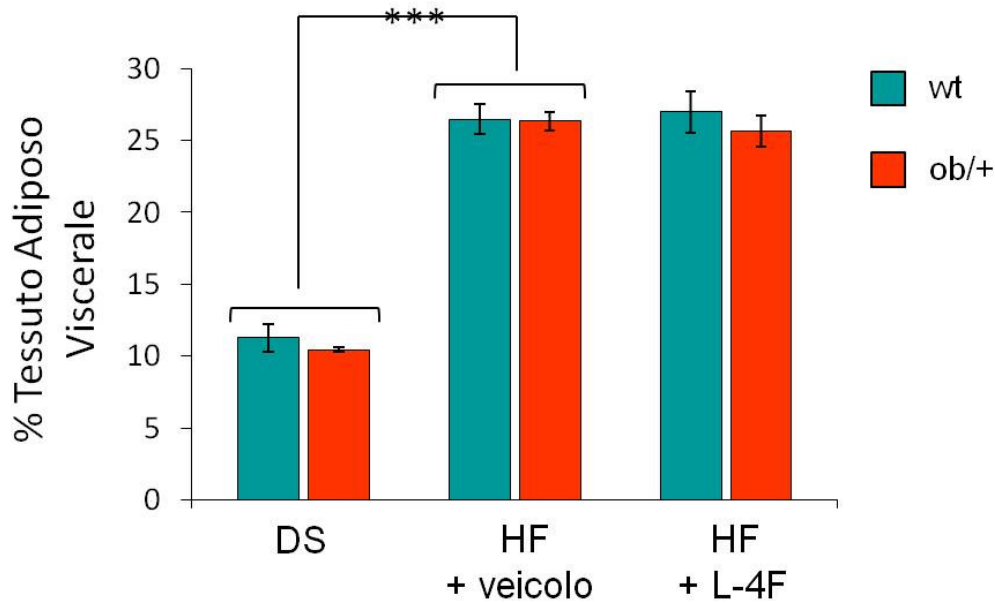


Figura 11. Percentuale del tessuto adiposo viscerale (*) $p < 0.001$).**

Effetti sull'accumulo di grasso epatico

In seguito all'acquisizione delle immagini ottenute in risonanza magnetica è stata scelta la sezione assiale in cui fosse possibile visualizzare il fegato nelle sue dimensioni maggiori e su cui compiere l'analisi spettroscopica allo scopo di valutare l'accumulo di grasso epatico nei due gruppi di animali e nelle diverse condizioni di dieta e trattamento. Nella figura 12 sono mostrati, a titolo esemplificativo, alcuni spettri individuali ottenuti dagli animali appartenenti ai diversi gruppi sperimentali.

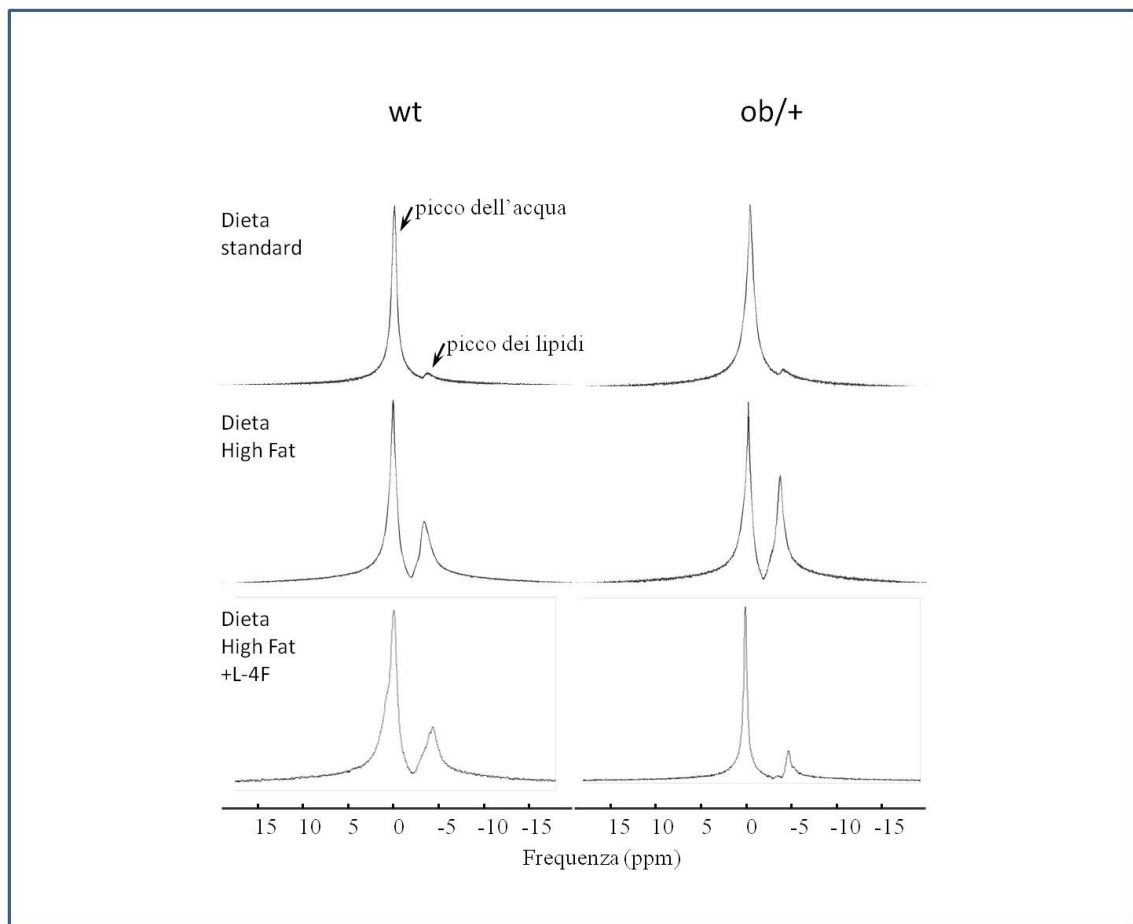


Figura 12. Curve rappresentative di spettri ottenuti per la quantificazione del grasso epatico nei diversi gruppi di animali e nei diversi regimi alimentari.

Per ciascun gruppo di animali la quantificazione del contenuto lipidico del fegato veniva calcolata come media del rapporto percentuale tra il picco del grasso e quello dell'acqua. I risultati ottenuti sono mostrati sotto forma di istogrammi nella figura 13.

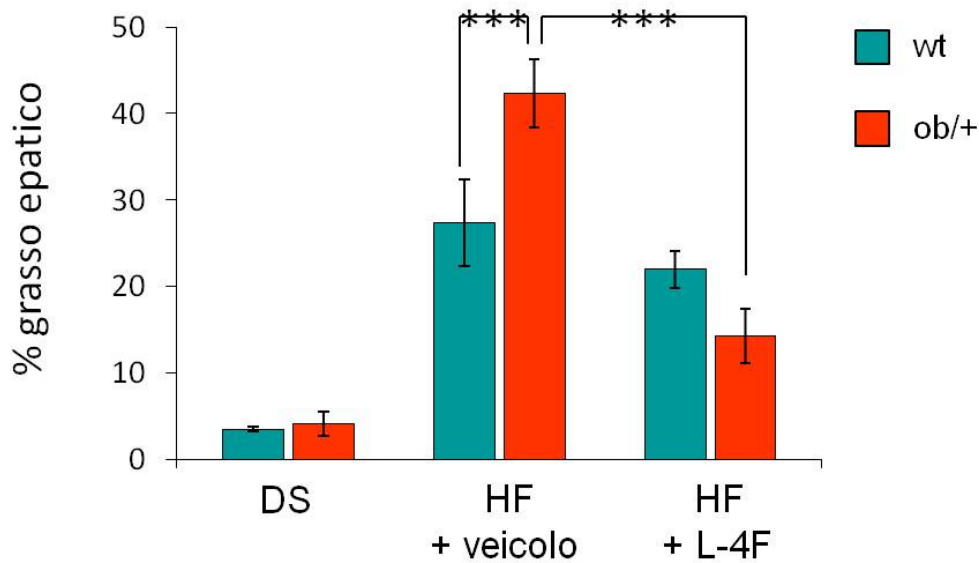


Figura 13. Contenuto di grasso epatico nei diversi gruppi di animali (p<0.001).**

L'analisi dei risultati ottenuti mostra valori paragonabili del contenuto di grasso epatico nei due ceppi in condizioni di dieta standard ($3.5 \pm 0.3\%$ negli animali wt e $4.2 \pm 1.4\%$ negli *ob/+*). In entrambi i ceppi, il regime ipercalorico induce un notevole e significativo accumulo di grasso a livello del fegato ($p < 0.001$ vs dieta standard). Nei wt il valore sale al $27.4 \pm 5.1\%$, mentre negli *ob/+* l'accumulo di grasso epatico è più marcato, raggiungendo il valore di $42.3 \pm 4.0\%$ ($p < 0.001$ rispetto ai wt HF). Anche in questo caso l'interazione genotipo-dieta produce un evidente effetto additivo.

Nuovamente, il trattamento con L-4F esercita un effetto benefico, in particolare in associazione con il genotipo *ob/+*. Il contenuto di grasso epatico viene infatti ridotto dal trattamento alla percentuale del $14.3 \pm 3.1\%$ negli *ob/+* ($p < 0.001$ vs *ob/+* HF + veicolo), mentre nei wt la riduzione riscontrata ($22.0 \pm 2.1\%$) non è significativa.

Effetti sulla funzionalità cardiaca

La funzionalità cardiaca dei due ceppi di animali e nelle diverse condizioni è stata valutata attraverso analisi ecocardiografiche. In particolare sono state effettuate misurazioni per quanto riguarda la frazione di accorciamento (FS, "fractional shortening"), che rappresenta un indice di funzionalità ventricolare intesa come capacità pompante dell'organo, e la frazione di ispessimento delle pareti del ventricolo sinistro in sistole (LVWT, "left ventricle wall thickening"), che è un indice di contrattilità della parete cardiaca. Queste analisi sono state effettuate ad un tempo intermedio di 10 settimane ed al termine delle 18 settimane di studio, sia in regime di dieta standard che di dieta High Fat e, in quest'ultimo caso, in assenza e in presenza del trattamento con il peptide L-4F. Nella figura 14(A) sono riportati i risultati ottenuti dopo le 10 settimane di dieta. I dati evidenziano che in regime di dieta standard la funzione ventricolare non mostra alterazione fra i ceppi wt ed *ob/+*. In seguito a 10 settimane di dieta iperlipidica, in entrambi i ceppi si evidenzia un peggioramento della frazione di accorciamento rispetto alla dieta standard ($54.6 \pm 1\%$ vs $59.8 \pm 1\%$ nei wt, $p < 0.01$ e $49.3 \pm 0.7\%$ vs $59.1 \pm 2.1\%$ negli *ob/+*, $p < 0.001$), ma con una riduzione di funzionalità cardiaca significativamente maggiore nel ceppo eterozigote rispetto a quello nativo ($p < 0.001$) (figura 14, A). Al termine delle 18 settimane di dieta iperlipidica ed in assenza del trattamento si denota solo una lieve ulteriore riduzione della frazione di accorciamento nei topi wt che, tuttavia, non raggiunge la significatività (figura 14, B). Al contrario, negli animali *ob/+* la funzionalità cardiaca risulta significativamente peggiorata, scendendo fino al $44.9 \pm 2.4\%$ ($p < 0.05$ vs le 10 settimane).

Il trattamento farmacologico con il peptide recupera parzialmente ma significativamente la funzione cardiaca negli *ob/+* ($51.5 \pm 1\%$, $p < 0.01$ rispetto al valore in assenza di trattamento), mentre non produce effetti significativi sui topi *wt* ($51.4 \pm 1\%$ al termine delle 8 settimane con L-4F).

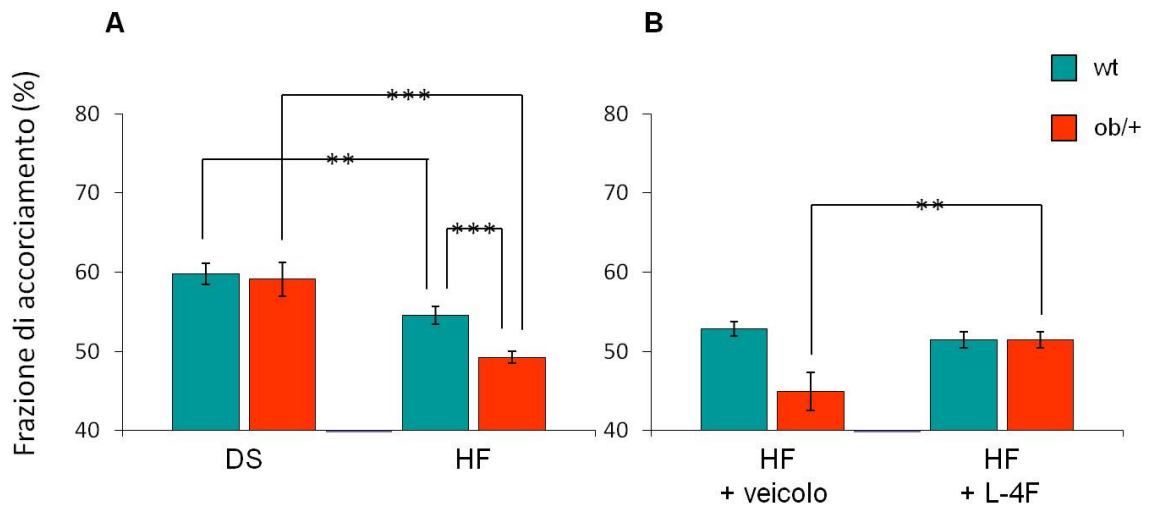


Figura 14. Frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (%) alle 10 settimane (A) ed alle 18 settimane (B) ($p < 0.01$; *** $p < 0.001$).**

Per quanto riguarda la frazione di ispessimento del ventricolo sinistro, a 10 settimane di dieta standard e/o di dieta iperlipidica abbiamo ottenuto valori simili in entrambi i ceppi di animali (figura 15, A).

Al contrario, al termine delle 18 settimane di dieta High Fat ed in assenza di trattamento (figura 15,B) la frazione di ispessimento si riduce lievemente ($p = 0.049$, vs dieta standard) nei topi *wt* e in maniera molto più evidente nei topi *ob/+* ($p < 0.001$), sottolineando ancora una volta l'interazione tra genotipo e dieta anche nell'esito della contrattilità delle pareti ventricolari ($p < 0.001$ *ob/+* vs *wt*).

Anche in questo caso, il trattamento con L-4F recupera significativamente la capacità contrattile negli animali *ob/+* ($70.7 \pm 2.3\%$, $p<0.001$), mentre non sembra avere alcun effetto sugli animali wt.

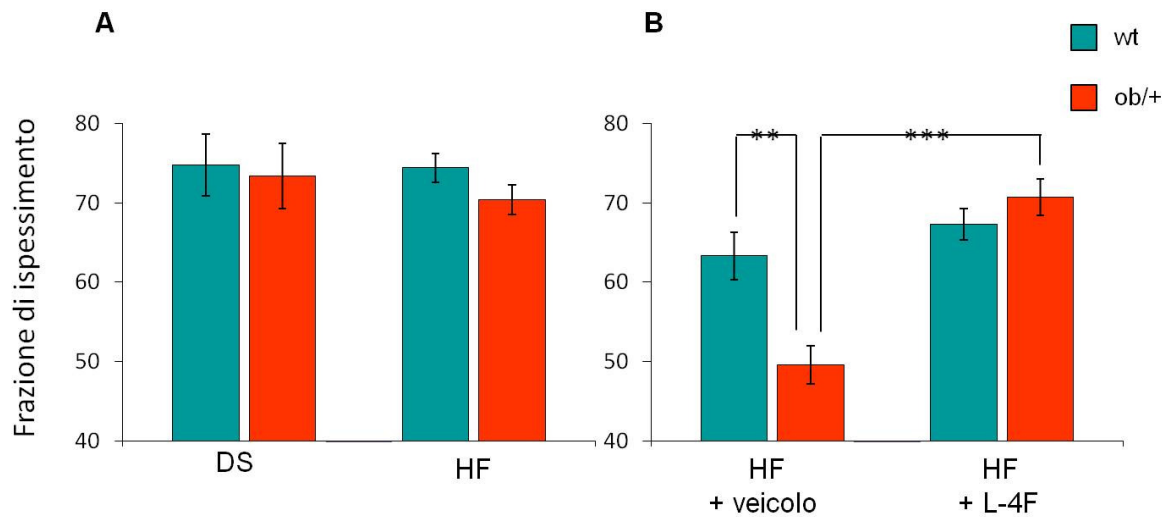


Figura 15. Frazione di ispessimento della parete del ventricolo sinistro alle 10 settimane (A) ed alle 18 settimane (B) ($p<0.01$; *** $p<0.001$).**

Effetti sull'espressione proteica e sulla fosforilazione del recettore dell'insulina, di AKT e AMPK

Con lo scopo di indagare i meccanismi molecolari alla base di alterazioni della funzione cardiaca, abbiamo effettuato l'analisi dell'espressione proteica su omogenati di cuore dei diversi gruppi di animali, mediante Western Blot, di alcune molecole coinvolte nelle vie di regolazione del metabolismo energetico: il recettore dell'insulina e le chinasi AKT e AMPK. Per ogni molecola presa in considerazione è stato valutato anche il grado di fosforilazione che ne condiziona l'attività.

Per quanto concerne l'espressione totale del recettore dell'insulina, questa non risulta variata nelle diverse condizioni. Tuttavia, in seguito ad un regime ipercalorico, si osserva un aumento dello stato di fosforilazione del recettore negli animali eterozigoti (figura 16): questo aumento è significativamente superiore sia rispetto agli stessi animali nutriti con dieta standard sia rispetto ai wild type nutriti con dieta High Fat ($p < 0.001$). In seguito al trattamento con il peptide L-4F il livello di fosforilazione in questi animali viene parzialmente ridotto, anche se non raggiunge livelli di significatività ($p = 0.08$).

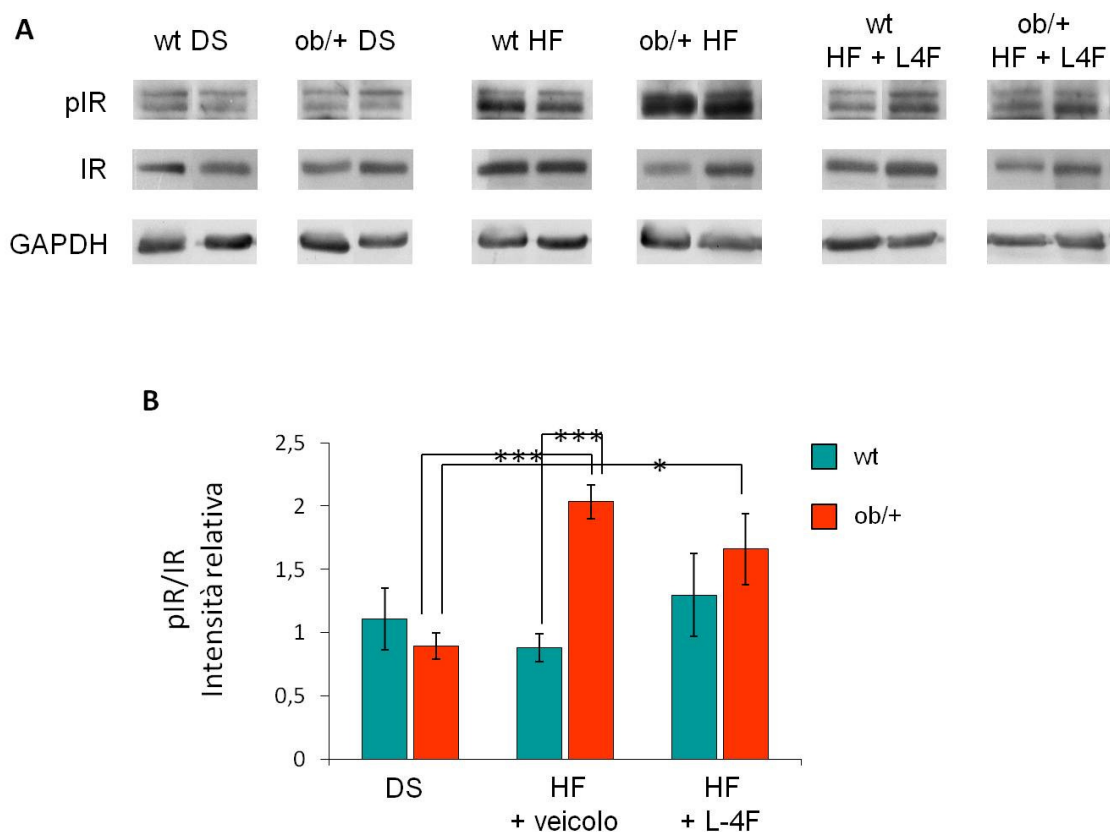


Figura 16. (A) Esempi rappresentativi dell'espressione della forma fosforilata (pIR) e totale (IR) del recettore dell'insulina. GAPDH è usata come proteina di riferimento nei diversi gruppi di animali. **(B)** Istogramma relativo al rapporto tra forma fosforilata e totale (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Successivamente abbiamo valutato l'espressione e lo stato di fosforilazione della chinasi AKT; questa molecola risulta coinvolta nella cascata di segnale intracellulare attivata dal recettore dell'insulina. Come illustrato nella figura 17, non si osservano variazioni significative sia per quanto riguarda l'espressione della chinasi sia per quanto riguarda il suo livello di fosforilazione in nessuno dei gruppi di animali esaminati e dei regimi dietetici

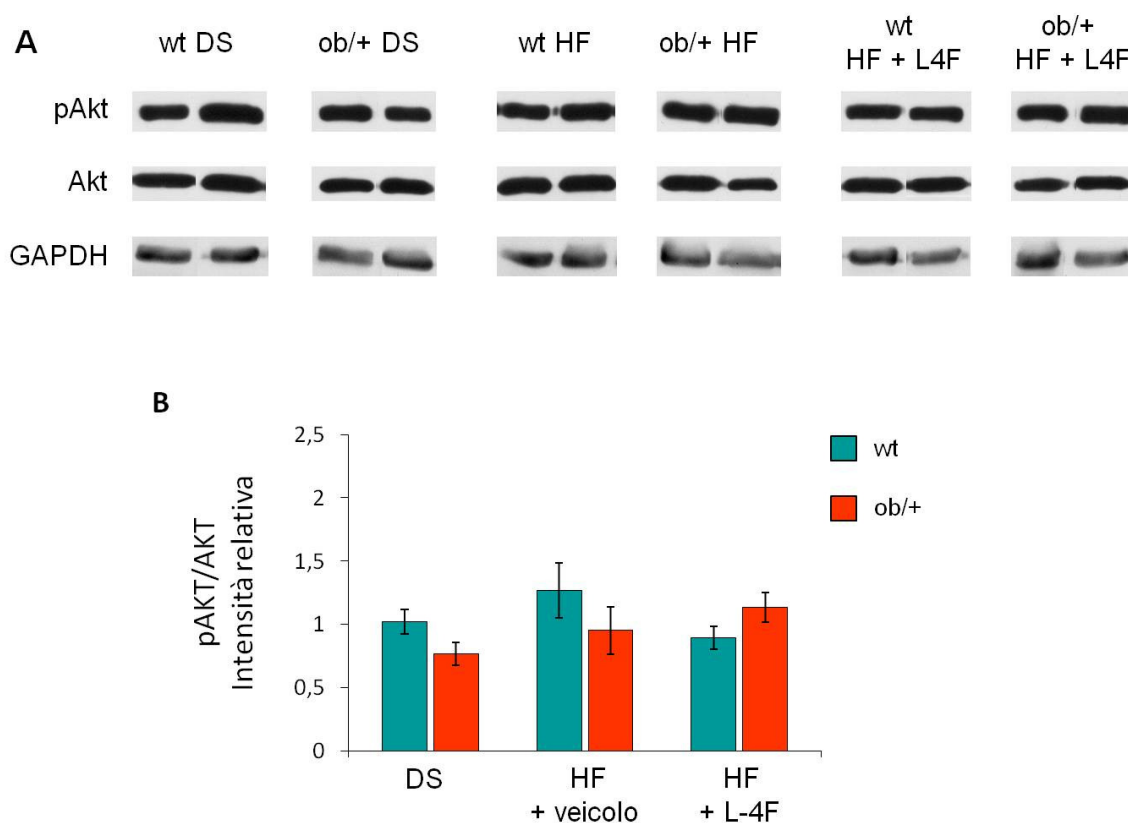


Figura 17. (A) Esempi rappresentativi dell'espressione della forma fosforilata (pAKT) e totale di AKT. GAPDH è usata come proteina di riferimento. (B) Istogramma relativo al rapporto tra forma fosforilata e totale nei diversi gruppi di animali.

Infine è stata valutata l'espressione e lo stato di attivazione della chinasi AMPK, che è uno dei principali indicatori dello stato energetico cellulare ed è stata indicata come un mediatore degli effetti della leptina sul metabolismo del muscolo (*Minokoshi et al, 2002*). Mentre l'espressione di questa molecola rimane invariata in entrambi i ceppi, wt e *ob/+*, ed in tutte le condizioni prese in considerazione, è invece evidente una marcata riduzione ($p < 0.01$) dello stato di fosforilazione di questa molecola in associazione con la parziale deficienza di leptina degli animali eterozigoti nutriti con un regime alimentare iperlipidico

(figura 18). Ancora una volta, il trattamento con il peptide L-4F si è dimostrato in grado di riportare lo stato di fosforilazione a livelli paragonabili a quelli degli animali nutriti in dieta normocalorica. Gli animali wild type non evidenziano invece variazioni dello stato di fosforilazione di AMPK in nessuna delle condizioni esaminate.

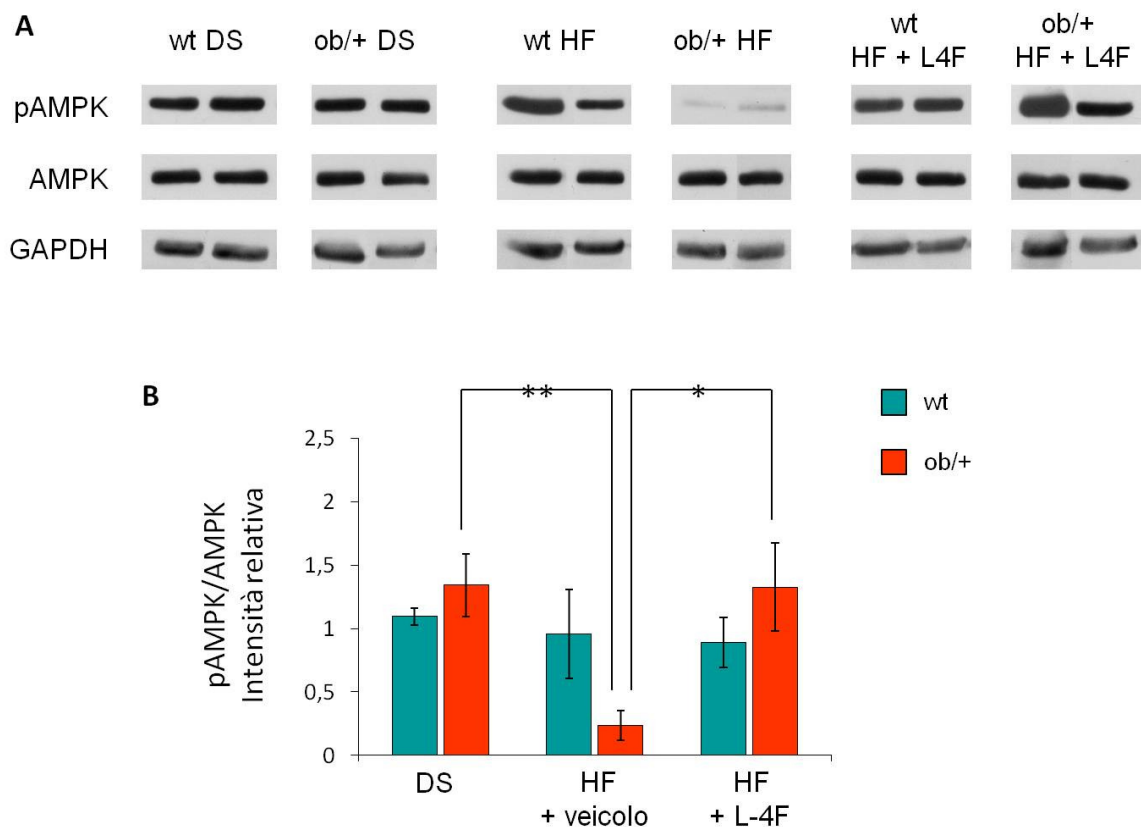


Figura 18. (A) Esempi rappresentativi dell'espressione della forma fosforilata (pAMPK) e totale di AMPK. GAPDH è usata come proteina di riferimento. (B) Istogramma relativo al rapporto tra forma fosforilata e totale nei diversi gruppi di animali (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Discussione

L'insieme dei risultati ottenuti in questo studio sperimentale mostra come la parziale deficienza di leptina possa rappresentare una condizione aggravante nello sviluppo di obesità e di complicanze metaboliche e cardiovascolari, in particolare in un contesto di regime dietetico iperlipidico. I nostri dati mostrano infatti che, in condizioni di dieta standard o normocalorica, gli animali con parziale deficienza di leptina non evidenziano particolari differenze rispetto ai controlli wild type. Al contrario, se alimentati con una dieta ipercalorica, gli animali *ob/+* mostrano un aumento significativamente maggiore del peso corporeo, del contenuto di tessuto adiposo, in particolare sottocutaneo, ed anche del grasso epatico, evidenziando così l'esistenza di un'interazione tra genotipo e dieta. Negli ultimi anni è emerso il ruolo che il tessuto adiposo svolge come organo endocrino, attraverso la produzione di adipochine e citochine (Trayurn & Wood, 2004; Galic et al, 2010); in questo quadro, la parziale deficienza di leptina, oltre a determinare un accumulo di questo tessuto, potrebbe anche determinare alterazioni, con meccanismi ancora da chiarire, della funzione endocrina di quest'organo. Nei nostri animali infatti, in associazione con la deficienza di leptina, abbiamo riscontrato anche una riduzione dei livelli di adiponectina ed un aumento di IL-6 quali conseguenza della dieta ipercalorica. Considerando che questa interleuchina può essere secreta anche dai macrofagi infiltrati nel tessuto adiposo (Vachharajani & Granger, 2009; Alkhouri et al, 2010), le nostre osservazioni sembrano concordare con l'idea che l'aumento di peso associato ad uno stato infiammatorio cronico, possa portare allo sviluppo di complicanze, come l'insulino-resistenza. Anche nel nostro modello è stata rilevata una ridotta

sensibilità verso l'insulina ed in parallelo sono stati osservati aumenti nei parametri plasmatici, riguardanti glicemia e profilo lipidico. In maniera simile, l'accumulo di grasso a livello epatico si riflette anche sulla funzionalità dell'organo, come indicato dalle alterazioni a carico di importanti enzimi markers, quali AST e ALT.

Nell'insieme il genotipo *ob/+*, in associazione ad una dieta ipercalorica, rappresenta quindi una condizione predisponente allo sviluppo di un quadro clinico caratterizzato da importanti fattori di rischio per l'insorgenza di patologie cardiovascolari. In diversi studi è stato evidenziato come sia una dieta ad alto contenuto di grassi sia alterazioni riguardanti la sintesi di leptina o le vie di signaling ad essa correlate possono provocare disfunzioni a livello cardiaco (*Buchanan et al, 2005; Ren & Ma, 2008; Cole et al, 2011*). In accordo con i dati di letteratura, nel nostro modello sperimentale *ob/+* alimentato con dieta iperlipidica abbiamo osservato un peggioramento, in termini di funzionalità e contrattilità cardiaca, rispetto al wild-type. Nonostante in questo studio non siano state eseguite analisi morfologiche ed istologiche per escludere con certezza un rimodellamento strutturale, i nostri dati mostrano un alterato quadro metabolico e suggeriscono che questo possa essere alla base del peggioramento della funzione cardiaca, come già riportato per modelli sperimentali simili (*Burgmaier et al, 2010; Daniels et al, 2010*).

In particolare, l'analisi di espressione proteica ha evidenziato variazioni riguardanti il grado di attivazione del recettore dell'insulina e della chinasi AMPK nei tessuti cardiaci degli animali eterozigoti nutriti con dieta iperlipidica.

Per quanto riguarda il recettore dell'insulina, in questi animali, l'aumento del suo stato di fosforilazione, che ne indica una maggiore attività, potrebbe sembrare

un dato in apparente contraddizione con la condizione di insulino-resistenza. Ciò nonostante, precedenti studi su cuore di topo omozigote *ob/ob* (Cook *et al*, 2010; Mazumder *et al*, 2004) hanno dimostrato che la cascata di segnalazione attivata dall'insulina può essere alterata anche a valle del recettore stesso, ad esempio coinvolgendo l'espressione di proteine implicate nella traslocazione dei trasportatori GLUT-4 sulla membrana cellulare.

Nella cascata di segnale intracellulare attivata dal recettore dell'insulina è coinvolta anche la chinasi AKT, ma nei campioni cardiaci analizzati non abbiamo osservato alcuna variazione nel suo stato di attività; questo dato potrebbe quindi indicare un possibile punto di blocco della trasduzione del segnale immediatamente a valle del recettore stesso. D'altra parte, nei lavori sopracitati i dati riguardanti l'attività di AKT appaiono in disaccordo, riportando in un caso un aumento e nell'altro una diminuzione dello stato di fosforilazione di questa proteina. Nell'insieme questi dati offrono quindi uno stimolo per un ulteriore approfondimento delle vie di trasduzione del segnale dell'insulina a livello cardiaco; inoltre sarebbe interessante verificare e definire in quale modo i meccanismi di insulino-resistenza nel cuore siano differenti rispetto a quelli riscontrati ad esempio nel fegato (Peterson *et al*, 2009).

La marcata riduzione dello stato di fosforilazione della chinasi AMPK nei topi *ob/+* può essere associata alla diminuita funzionalità e contrattilità cardiaca. Questa molecola, la cui attivazione è in relazione con il rapporto AMP/ATP, viene infatti considerata come uno dei più importanti sensori dello stato energetico della cellula (Hardie *et al*, 2012). Diversi studi su modelli genetici di obesità hanno mostrato una diminuita fosforilazione della chinasi AMPK in associazione con una ridotta efficienza cardiaca (Wang & Unger, 2005; Daniels

et al, 2010). Una ridotta attività di AMPK determina infatti una ridotta attivazione di tutti quei processi, come il trasporto intracellulare del glucosio, la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi, volti a fornire energia alla cellula cardiaca. Quindi, una diminuita capacità di produzione di ATP può determinare una riduzione della capacità contrattile, come testimoniato dalle analisi ecocardiografiche.

Con lo scopo di sviluppare una terapia nei confronti dell'obesità e dei possibili danni cardiovascolari che possono insorgere in seguito all'aumento di peso, la nostra attenzione si è concentrata sul peptide L-4F, mimetico dell'apolipoproteina A1 , come possibile trattamento farmacologico. Già in studi precedenti è stato messo in evidenza il ruolo che i peptidi mimetici dell'apoA1 svolgono come agenti anti-infiammatori (*deGoma & Rader, 2011*) ed in accordo con questi dati, anche nel nostro studio il peptide L-4F si è dimostrato in grado di ridurre i livelli circolanti di interleuchina-6, confermandone le proprietà anti-infiammatorie. Questo peptide inoltre può diminuire l'accumulo di grasso a livello del tessuto adiposo e del fegato, ripristinare una corretta risposta all'insulina e recuperare parzialmente la funzionalità cardiaca negli animali *ob/+*, nutriti con dieta iperlipidica. Le nostre osservazioni concordano con quelle riportate in un precedente studio su topi omozigoti *ob/ob* (*Peterson et al, 2008*), dove il peptide si è dimostrato efficace nel ridurre l'adiposità e migliorare la condizione di insulino-resistenza.

I nostri dati mostrano un'evidente interazione tra il trattamento con il peptide L-4F ed il genotipo eterozigote, in quanto l'L-4F mostra una maggior efficacia negli animali *ob/+* sulla maggior parte dei parametri analizzati. Visto che questo

peptide mostra effetti benefici sia su animali in cui la leptina è totalmente assente (*Peterson et al, 2008; Peterson et al, 2009*) sia su animali che presentano una parziale deficienza di questa molecola, sarebbe molto interessante approfondire in che modo l'L-4F interagisce con le vie alterate dalla disfunzione del signaling della leptina.

Sebbene questi dati siano relativi a modelli sperimentali animali, al momento il peptide L-4F è già in fase di sperimentazione clinica su pazienti affetti da patologia coronarica ed è stato dimostrato che tutte le dosi somministrate sono ben tollerate (*Watson et al, 2011*). Gli effetti benefici che il peptide L-4F esercita in associazione con un profilo genetico di carenza di leptina fanno ben sperare nella prospettiva di un ampliamento del suo utilizzo clinico, in particolare nell'ottica di una personalizzazione del trattamento farmacologico dei disordini metabolici e delle alterazioni cardiovascolari.

Bibliografia

Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* (Silver Spring), vol.14 (Suppl. 5), pp.242S-249S, 2006.

Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.105, pp.1243–1252, 2000.

Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Sangeeta K, Schauer PR, Feldstein AE. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.285, pp.3428–3438, 2010.

Anantharamaiah GM, Jones JL, Brouillette CG, Schmidt CF, Chung BH, Hughes TA, Bhowan AS, Segrest JP. Studies of synthetic peptide analogs of amphipathic helix I: structure of peptide/DMPC complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.260, pp.10248 –10255, 1985.

Anantharamaiah GM. Synthetic peptide analogs of apolipoproteins. *Methods in Enzymology*, vol.128, pp.627– 647, 1986.

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB Journal*, vol.13, pp.1231–1238, 1999.

Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology*, vol.146, pp.5341–5349, 2005.

Burgmaier M, Sen S, Philip M, Christopher R, Wilson CR, Miller CC, Young ME, Taegtmeier H. Metabolic adaptation follows contractile dysfunction in the heart of obese Zucker rats fed a high-fat “Western” diet. *Obesity (Silver Spring)*, vol.18, pp.1895–1901, 2010.

Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, Froguel P, Balding D, Scott J, Kooner JS. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nature Genetics*, vol.40, pp.716–718, 2008.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, vol.84, pp.491–495, 1996.

Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, Mackintosh R, Nicolson M, Boozer CN, Leibel RL. Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *The American Journal of Physiology*, vol.274, pp.R985-R990, 1998.

Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.108, pp.1113-1121, 2001.

Cole MA, Murray AJ, Cochlin LE, Heather LC, McAleese S, Knight NS, Sutton E, Jamil AA, Parassol N, Clarke K. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Research in Cardiology*, vol.106, pp.447–457, 2011.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics, *Physiology and Behavior*, vol. 81, pp.243–248, 2004.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine*, vol.334, pp.292-295, 1996.

Cook SA, Varela-Carver A, Mongillo M, Kleinert C, Khan MT, Leccisotti L, Strickland N, Matsui T, Das S, Rosenzweig A, Punjabi P, Camici PG. Abnormal myocardial insulin signalling in type 2 diabetes and left-ventricular dysfunction. *European Heart Journal*, vol.31, pp.100–111, 2010.

Daniels A, van Bilsen M, Janssen BJ, Brouns AE, Cleutjens JP, Roemen TH, Schaart G, van der Velden J, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA.

Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodeling. *Acta Physiologica*, vol.200, pp.11–22, 2010.

Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza CG, Mantzoros CS. Leptin in human physiology and therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol.31, pp.377–393, 2010.

Datta G, Chaddha M, Hama S, Navab M, Fogelman AM, Garber DW, Mishra VK, Epand RM, Epand RF, Lund-Katz S, Phillips MC, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. *Journal of Lipid Research*, vol.42, pp.1096 –1104, 2001.

DeGoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nature Reviews Cardiology*, vol.8, pp.266–277, 2011.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.105, pp.1827-1832, 2000.

Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, Jones S, Gibson WT, Trussell R, Jebb SA, Lip GY, O'Rahilly S. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature*, vol.414, pp.34–35, 2001.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *New England Journal of Medicine*, vol.341, pp.879–884, 1999.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Progress in Hormone Research*, vol. 59, pp.409-424, 2004.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, vol.1, pp.1311-1314, 1995.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, vol.395, pp.763–770, 1998.

Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes*, vol.48, pp.903–908, 1999.

Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*, vol.393, pp.7–20, 2006.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol.316, pp.129–139, 2010.

Gao Q, Horvath TL. Neuronal control of energy homeostasis, FEBS Letters, vol.582, pp.132–141, 2008.

Garber DW, Datta G, Chaddha M, Palgunachari MN, Hama SY, Navab M, Fogelman AM, Segrest JP, Anantharamaiah GM. A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis. Journal of Lipid Research, vol.42, pp.545–552, 2001.

Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, vol.17, pp.332–341, 2010.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol.13, pp.251-262, 2012.

Herrera BM, Lindgren CM. The genetics of obesity. Current Diabetes Reports, vol.10, pp.498–505, 2010.

Hirasawa T, Ohara T, Makino S. Genetic typing of the mouse ob mutation by PCR and restriction enzyme analysis. Experimental Animals, vol.46, pp.75-78, 1997.

Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S, Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548G/A) influences gene expression and adipose tissue

secretion of leptin. *Hormone and Metabolic Research*, vol.34, pp.355–359, 2002.

Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*, vol.271, pp.665 – 668, 1996.

Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, vol.107, pp.119–125, 1999.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, vol.88, pp.131-141, 1997.

Imaizumi S, Navab M, Morgantini C, Charles-Schoeman C, Su F, Gao F, Kwon M, Ganapathy E, Meriwether D, Farias-Eisner R, Fogelman AM, Reddy ST. Dysfunctional high-density lipoprotein and the potential of apolipoprotein A-1 mimetic peptides to normalize the composition and function of lipoproteins. *Circulation Journal*, vol.75, pp.1533-1538, 2011.

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of Heredity*, vol.41, pp.317–318, 1950.

Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Kiyoshi M, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Inazawa J, Kazuwa N. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.270, pp.27728–27733, 1995.

Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol.967, pp.379–388, 2002.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.116, pp.1784–1792, 2006.

Kannel WB, D'Agostino RB, Cobb JL. Effect of weight on cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol.63, pp.419S–422S, 1996.

Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I. *Journal of Lipid Research*, vol.31, pp.645–652, 1990.

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.117, pp.2621–2637, 2007.

Kimura K, Tsuda K, Baba A, Kawabe T, Boh-oka S, Ibata M, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Involvement of nitric oxide in endothelium dependent arterial relaxation by leptin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 273, pp.745–749, 2000.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology*, vol.4, pp.371-379, 2004.

Larsson B. Obesity, fat distribution and cardiovascular disease. *International Journal of Obesity*, vol.15 (Suppl.2), pp.53–57, 1991.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, vol.379, pp.632–635, 1996.

Leibel RL, Chung WK, Chua SC Jr. The molecular genetics of rodent single gene obesities. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.272, pp.31937–31940, 1997.

Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*, vol. 49, pp.293–297, 2000.

Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB Journal*, vol.12, pp.57–65, 1998.

Maciejko JJ, Holmes DR, Kottke BA, Zinsmeister AR, Dinh DM, Mao SJ. Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary-artery disease. *New England Journal of Medicine*, vol.309, pp.385–389, 1983.

Mantzoros CS, Ozata M, Negrao AB, Suchard MA, Ziotopoulou M, Caglayan S, Elashoff RM, Cogswell RJ, Negro P, Liberty V, Wong ML, Veldhuis J, Ozdemir IC, Gold PW, Flier JS, Licinio J. Synchronicity of frequently sampled thyrotropin (TSH) and leptin concentrations in healthy adults and leptin deficient subjects: evidence for possible partial TSH regulation by leptin in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.86, pp.3284–3291, 2001.

Matochik JA, London ED, Yildiz BO, Ozata M, Caglayan S, DePaoli AM, Wong ML, Licinio J. Effect of leptin replacement on brain structure in genetically leptin-deficient adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.90, pp.2851–2854, 2005.

Mathieu P, Pibarot P, Larose E, Poirier P, Marette A, Després JP. Visceral obesity and the heart. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol 40, pp 821-836, 2008.

Mazumder PK, O'Neill BT, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, vol.53, pp.2366-2374, 2004.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, vol.415, pp.339-343, 2002.

Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes*, vol.47, pp.294-297, 1998.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, vol.387, pp.903–908, 1997.

Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol.297, pp.E1247-E1259, 2009.

Munzberg H. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum of Nutrition*, vol. 63, pp.123-132, 2010.

Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, Lallone R, Fogelman AM. Oral administration of an apo A-I mimetic peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation*, vol.105, pp.290–292, 2002.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, Wagner AC, Frank JS, Datta G, Garber D, Fogelman AM. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, vol.109, pp.3215–3220, 2004.

O’Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*, vol.462, pp.307–3149, 2009.

O’Rahilly S, Farooqi IS. Human obesity: a heritable neurobehavioral disorder that is highly sensitive to environmental conditions. *Diabetes*, vol.57, pp.2905–2910, 2008.

Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.278, pp.9073-9085, 2003.

Palgunachari MN, Mishra VK, Lund-Katz S, Phillips MC, Adeyeye SO, Alluri S, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol.16, pp.328–338, 1996.

Peterson SJ, Drummond G, Kim DH, Li M, Kruger AL, Ikehara S, Abraham NG. L-4F treatment reduces adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity in obese mice. *Journal of Lipid Research*, vol.49, pp.1658–1669, 2008.

Peterson SJ, Kim DH, Li M, Positano V, Vanella L, Rodella LF, Piccolomini F, Puri N, Gastaldelli A, Kusmic C, L'Abbate A, Abraham NG. The L-4F mimetic peptide prevents insulin resistance through increased levels of HO-1, pAMPK, and pAKT in obese mice. *Journal of Lipid Research*, vol.50, pp.1293–1304, 2009.

Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.116, pp.3090–3100, 2006.

Ren J, Ma H. Impaired cardiac function in leptin-deficient mice. *Current Hypertension Reports*, vol.10, pp.448–453, 2008.

Sanchez VC, Goldstein J, Stuart RC, Hovanesian V, Huo L, Munzberg H, Friedman TC, Bjorbaek C, Nilni EA. Regulation of hypothalamic prohormone

convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *The Journal of Clinical Investigation*, vol.114, pp.357–369, 2004.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genetics*, vol.3:e115, 2007.

Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)*, vol.11, pp.8-20, 2012.

Sherman CB, Peterson SJ, Frishman WH. Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis. *Cardiology in Review*, vol.18, pp.141–147, 2010.

Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol.91, pp.3592–3597, 2006.

Swerdlloff RS, Batt RA, Bray GA. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, vol.98, pp.1359-1364, 1976.

Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology*, vol.138, 5063-5066, 1997.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, vol.92, pp.347–355, 2004.

Trayhurn P, Bing C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol.361, pp.1237-1249, 2006.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, vol.389, pp.610 – 614, 1997.

Vachharajani V, Granger DN. Adipose tissue: A motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB Life*, vol.61, pp.424–430, 2009.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genetics*, vol.20, pp.113-114, 1998.

Van der Velde AE. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World Journal of Gastroenterology*, vol.16, pp.5908–5915, 2010.

Vecoli C, Cao J, Neglia D, Inoue K, Sodhi K, Vanella L, Gabrielson KK, Bedja D, Paolocci N, L'Abbate A, Abraham NG. Apolipoprotein A-I mimetic peptide L-4F prevents myocardial and coronary dysfunction in diabetic mice. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.112, pp.2616-2626, 2011.

Venkatachalapathi YV, Phillips MC, Epand RM, Epand RF, Tytler EM, Segrest JP, Anantharamaiah GM. Effect of end group blockage on the properties of a class A amphipathic helical peptide. *Proteins*, vol.15, pp.349–359, 1993.

Wang MY, Unger RH. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol.288, pp.E216-E221, 2005.

Watson CE, Weissbach N, Kjems L, Ayalasomayajula S, Zhang Y, Chang I, Navab M, Hama S, Hough G, Reddy ST, Soffer D, Rader D, Fogelman AM, Schechter A. Treatment of patients with cardiovascular disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *Journal of Lipid Research*, vol.52, pp.361–373, 2011.

West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American Journal of Physiology*, vol.262, pp.R1025–R1032, 1992.

Winters B, Mo Z, Brooks-Asplund E, Kim S, Shoukas A, Li D, Nyhan D, Berkowitz DE. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial

dysfunction in obese (lep(ob)) mice. *Journal of Applied Physiology*, vol.89, pp.2382–2390, 2000.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.276, pp.25096–25100, 2001.

Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetics*, vol.20, pp.111-112, 1998.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, vol.372, pp.425–432, 1994.

Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *The Journal of Heredity*, vol.52, pp.275-278, 1961.

Ringraziamenti

In queste righe finali desidero ringraziare le persone che hanno permesso lo svolgimento di questo lavoro e tutte quelle che durante gli anni di studio mi sono state sempre vicine. Innanzitutto vorrei ringraziare la Dottoressa Claudia Kusmic per la sua disponibilità e per avermi accolto nel suo gruppo di ricerca. Inoltre un particolare ringraziamento va alla Dottoressa Cristina Barsanti per avermi insegnato ed aiutato in questi mesi. Vorrei anche ringraziare mio padre per avermi permesso di raggiungere questo obiettivo e per avermi sempre sostenuto durante questi anni di studio. Un ultimo ringraziamento, con tutto il mio cuore, va a Michele, che mi è sempre stato accanto lungo tutto il cammino.